

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 623**

51 Int. Cl.:

A61K 38/20 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.01.2006 E 16167879 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 3072522**

54 Título: **Tratamientos y métodos de combinación anti-KIR**

30 Prioridad:

06.01.2005 DK 200500026

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

25.11.2019

73 Titular/es:

INNATE PHARMA S.A. (50.0%)

117 Avenue de Luminy

13009 Marseille, FR y

NOVO NORDISK A/S (50.0%)

72 Inventor/es:

ROMAGNÉ, FRANÇOIS;

WAGTMANN, PETER, ANDREAS, NICOLAÏ,

REUMERT y

GLAMANN, JOAKIM

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 732 623 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Tratamientos y métodos de combinación anti-KIR

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere al tratamiento del cáncer y afecciones precancerosas, en las que se emplea un anticuerpo contra un receptor de tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos (KIR, de sus siglas en inglés) en combinación con otros tratamientos para el cáncer o preventivos para el cáncer.

10

Antecedentes de la invención

Los linfocitos citolíticos naturales (NK, de sus siglas en inglés) son un subconjunto de linfocitos granulares grandes que actúan como células inmunitarias citotóxicas. Las células NK se pueden identificar mediante cualquier número de marcadores de superficie celular conocidos que varían entre las especies (por ejemplo, en seres humanos, los CD56, CD16, NKp44, NKp46 y NKp30 se utilizan a menudo; en ratones NK1.1, Ly49A-W y CD49b se utilizan a menudo). En un estado activo, las células NK son capaces de destruir ciertas células tumorales autólogas, alogénicas e incluso xenogénicas, células infectadas por virus, ciertas bacterias (por ejemplo, *Salmonella typhi*) y otras células diana. Las células NK parecen destruir preferentemente a las células diana que expresan poca o ninguna molécula de histocompatibilidad principal de Clase I (MHCI o MHC-I, de sus siglas en inglés) en su superficie. Las células NK también destruyen células diana a las que se han unido moléculas de anticuerpos, un mecanismo conocido como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, de sus siglas en inglés). En acción contra las células diana, las células NK pueden liberar proteínas formadoras de poros llamadas perforinas, enzimas proteolíticas llamadas granzimas y citocinas/quimiocinas (por ejemplo, TNF α , IFN γ , etc.) que conducen directamente a la apoptosis o lisis de las células diana, o que regulan otras respuestas inmunitarias. Tras la activación, las células NK también pueden expresar el ligando Fas (FasL, de sus siglas en inglés), lo que permite a estas células inducir apoptosis en células que expresan Fas.

15

20

25

30

35

La suficiente actividad de las células NK y el recuento de células NK son ambos, normalmente, necesarios para desarrollar una respuesta inmunitaria adecuada mediada por células NK. Las células NK pueden estar presentes en números normales en un individuo, pero si no están activadas, estas células serán ineficaces para realizar funciones vitales del sistema inmunitario, como la eliminación de células anormales. La disminución de la actividad de las células NK está relacionada con el desarrollo y la progresión de muchas enfermedades. Por ejemplo, la investigación ha demostrado que la baja actividad de las células NK provoca una mayor susceptibilidad a enfermedades como el síndrome de fatiga crónica (SFC), las infecciones víricas y el desarrollo de cánceres.

40

La actividad de las células NK está regulada mediante receptores moduladores de la actividad de las células NK (NKCAMRs o simplemente AMR, de sus siglas en inglés), que pueden ser específicos para varios ligandos tales como moléculas MHC-I, homólogos de MHC-I u otras moléculas biológicas expresadas en células diana. Las células NK en un individuo normalmente presentan una serie de receptores activadores e inhibidores. La actividad de las células NK está regulada mediante un equilibrio de señales transducidas a través de estos receptores activadores e inhibidores. Cada tipo de NKCAMR se discute brevemente a continuación.

45

Cuando las células somáticas están bajo estrés, como en la progresión del cáncer o están infectadas, varias moléculas, tales como MICA y MICB, se muestran normalmente en la superficie de las células estresadas y las moléculas MHC-I que se muestran normalmente se "pierden" de la superficie celular (reducidas en número y/o glucosiladas de tal manera que no son "vistas" como "extrañas" por el sistema inmunitario). Los NKCAMR son sensibles a estos y otros cambios en las posibles células NK diana asociadas con el estrés celular, la enfermedad y el trastorno.

50

La mayoría de los NKCAMR parecen pertenecer a una de dos clases de proteínas: la superfamilia del receptor tipo inmunoglobulina (Ig) (IgSF, de sus siglas en inglés) o la superfamilia del receptor tipo lectina de tipo C (CTLR, de sus siglas en inglés) (véase, por ejemplo, Radaev y Sun, Annu. Rev. Biomol. Struct. 2003 32:93-114). Sin embargo, se conocen otras formas de NKCAMR. Las estructuras de una serie de NKCAMR se han dilucidado (*Id.*). Para ilustrar mejor la invención, los tipos de NKCAMR bien entendidos, con referencia a ejemplos particulares de los mismos, se describen aquí. Sin embargo, se conocen varios NKCAMR adicionales además de los receptores descritos explícitamente aquí (véase, por ejemplo, Farag et al., Expert Opin. Biol. Ther. 3(2):237-250) y las composiciones y usos de la invención descritos en el presente documento normalmente también serán aplicables a estos y otros NKCAMR.

60

Receptores activadores de células NK (NKCAR, de sus siglas en inglés)

Muchos receptores activadores de células NK (NKCAR) pertenecen a la superfamilia de Ig (IgSF) (dichos receptores también pueden denominarse en el presente documento receptores de tipo Ig o ILR). Los receptores activadores ILR de NK (AILR, de sus siglas en inglés) incluyen, por ejemplo, CD2, CD16, CD69, la molécula accesoria de ADN1 (DNAM-1, de sus siglas en inglés), 2B4, NK1.1; receptores activadores de tipo inmunoglobulina (Ig) de linfocitos

65

5 citolíticos (KAR); ILT/ILIR; y receptores de citotoxicidad natural (NCR, de sus siglas en inglés) tales como NKp44, NKp46 y NKp30. Varios otros NKCAR pertenecen a la superfamilia CLTR (por ejemplo, NKRP-1, CD69; heterodímeros CD94/NKG2C y CD94/NKG2E, homodímero NKG2D y, en ratones, isoformas activadoras de Ly49 (tal como Ly49A-D)). Aún otros NKCAR (por ejemplo, LFA-1 y VLA-4) pertenecen a la superfamilia de proteínas
 10 integrinas y otros receptores activadores pueden incluso tener otras estructuras distinguibles. Muchos NKCAR poseen dominios extracelulares que se unen a moléculas MHC-I, y dominios citoplásmicos que son relativamente cortos y carecen de motivos inmunorreceptores inhibidores basados en tirosina (ITIM) característicos de los receptores inhibidores de NK. Los dominios transmembrana de estos receptores incluyen normalmente un resto de aminoácido cargado que facilita su asociación con moléculas asociadas a la transducción de señales, tales como CD3zeta,
 15 FcεRly, DAP12 y DAP10 (2B4, por ejemplo, parece ser una excepción a esta regla general), que contienen secuencias de aminoácidos cortas denominadas "motivos inmunorreceptores activadores basados en tirosina" (ITAM, de sus siglas en inglés) que propagan señales activadoras de células NK. El receptor 2B4 contiene 4 motivos inmunorreceptores interruptores basados en tirosina (ITSM, de sus siglas en inglés) en su cola citoplásmica; los ITSM también se pueden encontrar en los NKCAR CS1/CRACC y NTB-A. Los dominios citoplásmicos de 2B4 y SLAM contienen dos o más motivos únicos basados en tirosina que se asemejan a los motivos presentes en los receptores activadores e inhibidores y pueden reclutar las proteínas SHP-2 y SAP (proteína asociada a SLAM) que contienen el dominio SH2.

20 Las moléculas inducidas por estrés, tales como MIC-A, MIC-B y ULBP en seres humanos, y Rae-1 y H-60 en ratones, pueden servir como ligandos para NKCAR, tal como el homodímero NKG2D. Los hidratos de carbono celulares, los antígenos patógenos y los anticuerpos también pueden ser ligandos de NKCAR. Por ejemplo, NKR-P1 puede unirse a ligandos de hidratos de carbono y desencadenar la activación de células NK, particularmente contra células tumorales que exhiben patrones de glucosilación anómalos. Las hemaglutininas víricas pueden servir como ligandos para receptores citotóxicos naturales (NCR, de sus siglas en inglés), tales como los NKCAR ILR NKp30, NKp44, NKp46 y NKp80.

Los NKCAR pueden transducir directamente señales activadoras o pueden actuar en conexión con moléculas adaptadoras u otros receptores (ya sea en el contexto de una respuesta coordinada entre receptores que a veces son particularmente eficaces o en el contexto de emparejamiento de correceptor-receptor). Por ejemplo, los NCR
 30 NKCAR carecen normalmente de ITAM y, por consiguiente, se unen a las moléculas adaptadoras a través de un resto cargado en sus dominios transmembrana (por ejemplo, NKp30 se asocia con la cadena zeta de CD3; NKp44 se asocia con DAP12 y/o KARAP; NKp46 está acoplado a la cadena FcRly y cadena zeta de CD3), que son, a su vez, capaces de reclutar proteínas tirosina cinasas (PTK, de sus siglas en inglés) para propagar señales activadoras de células NK. CD16, que es un importante NKCAR para la producción de citocinas y ADCC mediada por células NK, se asocia con homodímeros o heterodímeros formados por cadenas zeta y/o gamma de CD3. NKG2D parece desempeñar un papel complementario y/o sinérgico con NCR y NKCAR en la activación de células NK. La activación de las células NK contra dianas particulares puede requerir la activación coordinada de múltiples NKCAR o NCR, o solo la acción de un único receptor. Otras moléculas de superficie desencadenantes, que incluyen 2B4 y NKp80, parecen funcionar como correceptores para la activación de células NK.

40 Algunas células NK expresan las isoformas activadoras de KIR humanos (por ejemplo, KIR2DS y KIR3DS) y proteínas murinas Ly-49 (por ejemplo, Ly-49D y Ly-49H). Estas moléculas difieren de sus homólogas inhibidoras (analizadas a continuación) por carecer de ITIM en sus dominios citoplásmicos relativamente más cortos y por poseer una región transmembrana cargada que se asocia con polipéptidos transductores de señales, tales como dímeros unidos por disulfuro de DAP12.

Receptores inhibidores NKIR de células NK

50 Los receptores inhibidores ILR (IgSF) de células NK (NKIR) (I) incluyen varios KIR humanos diferentes, específicos para los alotipos HLA-A, -B o -C (los KIR pueden reconocer múltiples alelos dentro de un alotipo particular, por ejemplo, KIR2DL1 reconoce los alotipos HLA-Cw2, 4 y 6). Los receptores inhibidores de la superfamilia CTLR incluyen miembros de la familia de proteínas CD94/NKG2, que comprenden receptores formados por CD94 de tipo lectina con varios miembros de la familia NKG2, tales como NKG2A, y reconocen las moléculas de clase I no clásicas HLA-E y Qa-1 en seres humanos y ratones, respectivamente, y las moléculas de Ly49 murinas que reconocen las moléculas MHC de clase I clásicas en ratones. En contraste aún más, NKRP1A, Nkrplf y Nkrpld son receptores inhibidores cuyos ligandos no están relacionados con MHC pero son miembros de la familia CTLR expresados en diversos tipos de células, tales como células dendríticas, macrófagos y linfocitos.

60 Los NKIR específicos de MHC de clase I incluyen los receptores CTLR Ly-49 en ratones; los receptores IgSF, los receptores de tipo inmunoglobulinas leucocitarias en seres humanos, los receptores de tipo inmunoglobulinas de linfocitos citolíticos (KIR, por ejemplo, p58 y p70 en seres humanos) y los receptores CTLR CD94/NKG2 en ratones y seres humanos. Todos los NKIR específicos de MHC-I parecen utilizar un mecanismo inhibitor habitual que aparentemente implica la fosforilación de ITIM en sus dominios citoplásmicos en el curso de la unión de MHC-I y el reclutamiento de tirosina fosfatasa (por ejemplo, SHP-1 y SHP-2) a los ITIM fosforilados, que da como resultado la inhibición de las proteínas tirosina cinasas proximales (PTK) implicadas en la activación de NK a través de NKCAR.

Los heterodímeros inhibidores CD94/NKG2 formados a partir de glucoproteínas de CTLR, comprenden una molécula NKG2 portadora de ITIM (por ejemplo, NKG2A) y se unen a moléculas MHC-I no clásicas (por ejemplo, HLA-E en seres humanos y Qa-1 en ratones).

- 5 Los receptores inhibidores Ly-49 son glucoproteínas murinas de CTLR homodímeras de membrana unidas por disulfuro tipo II, que se unen a varias moléculas MHC-I y suministran señales inhibitoras (negativas) normalmente dominantes a las células NK. Ly-49A, por ejemplo, se une a los dominios alfa1/alfa2 de la molécula MHC-I H-2Dd, mientras que Ly-49C se une a H-2Kb. Las células NK humanas parecen carecer de homólogos de los receptores Ly-49 murinos. En su lugar, las células NK humanas expresan KIR, que no se encuentran en las células NK de ratón.
- 10 Aunque los KIR humanos y los receptores Ly-49 de ratón carecen de homología estructural, son funcionalmente ortólogos: ambos tipos de receptores se unen a HLA de clase I en las células diana, dando como resultado la inhibición de la citotoxicidad mediada por NK.

- 15 Un tipo importante de NKCI es el KIR. En general, los KIR son glucoproteínas de la superficie celular, que comprenden de uno a tres dominios de tipo inmunoglobulina extracelular, que se expresan mediante algunos linfocitos T, así como en la mayoría de las células NK humanas. Varios KIR están bien caracterizados (véase, por ejemplo, Carrington y Norman, The KIR Gene Cluster, miércoles 28 de mayo de 2003, disponible a través del sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bookres.fcgi/mono_003/ch1d1.pdf). Los KIR humanos incluyen KIR2DL y KIR3DL (a los KIR también se les puede hacer referencia con otros nombres, tales como CD158e1, CD158k, CD158z, p58 KIR CD158e1 (p70), CD244, etc.) (véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. 20040038894; Radaev et al., Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 32:93-114 (2003); Cerwekna et al., Nat. Rev. Immunol. 1:41-49 (2001); Farag et al., Expert Opin. Biol. Ther., 3(2):237-250 (2003); Biassoni et al., J. Cell. Mol. Med., 7(4):376-387 (2003); y Warren et al., British J. Haematology, 121:793-804 (2003)). La estructura de varios KIR se ha dilucidado y revela una notable similitud estructural entre estas proteínas. Véase, por ejemplo, Radaev et al., *citado anteriormente*.
- 20
- 25

- Los KIR se pueden clasificar estructural y funcionalmente. Por ejemplo, la mayoría de los KIR tienen dos dominios de Ig (KIR KIR2D de 58 kDa), mientras que otros tienen tres dominios de Ig (KIR KIR3D de 70 kDa) (a veces, respectivamente, denominados moléculas p58 y p70). Los KIR también varían en la longitud de la cola citoplásmica.
- 30 Normalmente, los KIR con una cola citoplásmica relativamente larga (L) emiten una señal inhibitora, mientras que los KIR con una cola citoplásmica corta (S) pueden activar las respuestas de los linfocitos T o NK. La nomenclatura de los KIR, por consiguiente, se puede basar en el número de dominios extracelulares (KIR2D o KIR3D) y si la cola citoplásmica es larga (KIR2DL o KIR3DL) o corta (KIR2DS o KIR3DS). Se proporciona información adicional sobre la nomenclatura de los KIR en la siguiente descripción detallada de la invención. Algunos miembros de la "familia de KIR" son NKCAR o, más particularmente, KAR (por ejemplo, KIR2DS2 y KIR2DS4); normalmente comprenden uno o más restos transmembrana cargados (por ejemplo, Lys) que se asocian con una molécula adaptadora que tiene un ITAM (por ejemplo, DAP12). La porción intracitoplásmica de los KIR inhibidores normalmente comprende uno o más ITIM que reclutan fosfatasa. Los KIR inhibidores se unen a los dominios alfa1/alfa2 de las moléculas HLA. Los KIR inhibidores no parecen requerir normalmente asociación de molécula y adaptador para la actividad. A menos que se indique otra cosa, términos como "KIR", "KIRs" y similares se refieren a miembros de NKCI de la "familia de KIR" y términos como "KAR", "KARs" y similares se refieren a miembros de NKCAR de la "familia de KIR".
- 35
- 40

- Los KIR se pueden unir a moléculas MHC-I (por ejemplo, ciertos alotipos HLA de clase I), lo que normalmente da como resultado la transmisión de una señal negativa que contrarresta y puede anular la(s) señal(es) activadoras estimuladora(s) a la célula NK, evitando así que la célula NK destruya la posible célula diana asociada (aparentemente a través de la fosforilación de ITIM y el reclutamiento de tirosina fosfatasa (por ejemplo, proteínas tirosina fosfatasa que contienen el dominio SH2 tales como SHP-1 y SHP-2), lo que lleva a la desfosforilación de PTK (por ejemplo, Syk, TcR y/o ZAP70) y/o la inhibición de la formación de complejos LAT/PLCγ1 y la interrupción asociada de la(s) cascada(s) de ITAM). Debido a que los virus a menudo suprimen la expresión de MHC de clase I en las células que infectan, dichas células infectadas con virus se vuelven susceptibles de ser destruidas por las células NK. Debido a que las células cancerosas también tienen a menudo una expresión reducida o nula de MHC de clase I, estas células, además, se pueden volver susceptibles de ser destruidas por las células NK. Las células infectadas también pueden cambiar las proteínas unidas en el MHC en términos de glucosilación. Si esto ocurre, el complejo MHC-I:proteína que expresa la célula se verá alterado. Si los KIR asociados a NK no se pueden unir a estos complejos "extraños", no se puede generar una señal inhibitora y la lisis continuará.
- 45
- 50
- 55

- Todos los KIR inhibidores confirmados parecen interactuar con diferentes subconjuntos de antígenos HLA/MHC dependiendo del subtipo de KIR. En los seres humanos, los KIR que tienen dos dominios de Ig (KIR2D) reconocen los alotipos HLA-C: KIR2DL2 (anteriormente denominado p58.2) y el producto genético estrechamente relacionado KIR2DL3 reconocen un epítipo compartido por los alotipos HLA-C del grupo 1 (Cw1, 3, 7 y 8), mientras que KIR2DL1 (p58.1) reconoce un epítipo compartido por los alotipos recíprocos HLA-C del grupo 2 (Cw2, 4, 5 y 6). La especificidad de KIR2DL1 parece estar dictada por la presencia de un resto de Lys en la posición 80 de los alelos HLA-C del grupo 2. El reconocimiento de KIR2DL2 y KIR2DL3 parece estar dictado por la presencia de un resto Asn en la posición 80. Una gran mayoría de los alelos HLA-C tienen un resto Asn o Lys en la posición 80. Un KIR con tres dominios de Ig, KIR3DL1 (p70), reconoce un epítipo compartido por los alelos HLA-Bw4. Por último, un homodímero de moléculas con tres dominios de Ig, KIR3DL2 (p140), reconoce HLA-A3 y -A11.
- 60
- 65

Los receptores individuales de células NK específicos de MHC-I de cualquier tipo (activadores o inhibidores) normalmente no interactúan con todas las moléculas MHC de clase I, pero se unen específicamente a ciertos alotipos (proteínas codificadas por diferentes variantes de un solo locus genético). Asimismo, una célula NK individual puede expresar varios receptores inhibidores y/o activadores diferentes que funcionan independientemente entre sí. Por ejemplo, en seres humanos, la presencia o ausencia de un KIR dado es variable de una célula NK a otra dentro de un solo individuo. También hay un nivel relativamente alto de polimorfismo de KIR en seres humanos, con ciertas moléculas KIR presentes en algunos, pero no en todos, los individuos. Aunque los KIR y otros receptores inhibidores que reconocen el MHC pueden ser coexpresados por las células NK, en cualquier repertorio de NK de un individuo dado, normalmente hay células que expresan un solo KIR. En consecuencia, la actividad de las células NK correspondiente en este último tipo de células NK se inhibe solo por las células que expresan un grupo de alelos MHC-I específicos. De hecho, las estimaciones recientes de la extensión de la diversidad de genotipos KIR dentro de la población sugieren que < 0,24 % de los individuos no relacionados pueden esperar tener genotipos idénticos. El haplotipo caucásico más habitual, el haplotipo "A" (frecuencia de ~ 47-59 %), contiene solo un gen KIR activador (KIR2DS4) y seis loci KIR inhibidores (KIR3DL3, -2DL3, -2DL1, -2DL4, -3DL1 y -3DL2). Los haplotipos "B" restantes son muy diversos y contienen de 2 a 5 loci KIR activador (incluidos KIR2DS1, -2DS2, -2DS3 y -2DS5).

Los anticuerpos contra los receptores NK, tales como los KIR, se han descrito previamente y también ha habido al menos alguna sugerencia de combinar anticuerpos anti-receptor NK, tales como los anticuerpos anti-KIR, con otros agentes anticancerígenos en la técnica anterior. Por ejemplo, el documento WO2004056392 describe anticuerpos anti-NKp30 y/o anti-NKp46 utilizados en mezcla con interleucina-2 (IL-2). El documento WO2005009465 describe la combinación de un anticuerpo terapéutico (por ejemplo, Rituxan) en combinación con un compuesto que bloquee un receptor inhibidor o estimula un receptor activador de una célula NK (por ejemplo, un AcM anti-KIR, tal como el AcM DF200) para mejorar la eficacia del tratamiento con anticuerpos terapéuticos en sujetos humanos (véase también el documento US 20050037002). El documento WO2005079766 también describe combinaciones de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos antifactor tisular) que incluyen anticuerpos anti-KIR para su uso en terapias contra el cáncer. Los documentos WO2005003168 y WO2005003172 describen combinaciones de varios anticuerpos anti-KIR con varios agentes, incluyendo IL-2 y IL-21. El documento WO2005037306 describe de manera similar combinaciones de IL-21, derivados de IL-21 y análogos de IL-21 en combinación con anticuerpos anti-KIR. C. Y. Koh et al., Blood 97, 3132-3137 (2001) y Koh et al., Biol Blood Marrow Transplant. 2002;8(1):17-25 describen el fragmento 5E6 de anticuerpo anti-Ly49C/I. Sin embargo, ninguna de estas referencias menciona una combinación con IL-21. Brady et al., The Journal of Immunology, 172, (2004) 2048-2058 describen el efecto de IL-21 en las células NK.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere al uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-KIR2DL con reacción cruzada con KIR2DL1 y KIR2DL2/3 o fragmento de unión del mismo, y una interleucina-21 (IL-21) para la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer. En consecuencia, un anticuerpo contra un KIR se emplea en combinación con otro tratamiento del cáncer o preventivo del cáncer para tratar el cáncer y afecciones precancerosas. Los usos médicos de la invención se pueden modificar mediante el uso adicional de uno o más anticuerpos terapéuticos específicos para un ligando en células cancerosas. En una variación particular de esta característica adicional, el uno o más anticuerpos terapéuticos específicos para un ligando en células cancerosas se seleccionan de anti-HER-2 (por ejemplo, Trastuzumab); anti-CD20 (por ejemplo, Rituximab, Ibritumomab tiuxetan o Tositu-mumab-I131); anti-EGFR (por ejemplo, Cetuximab); anti-VEGF (por ejemplo, Gemtuzumab ozogamicin); anti-CD22, anti-CD33 (por ejemplo, Gemtuzumab); y anti-CD52 (por ejemplo, Alemtuzumab).

En otro aspecto, los usos médicos de la invención pueden modificarse adicionalmente mediante la aplicación de un tratamiento de quimioterapia con uno o más agentes de quimioterapia. En un aspecto particular, el agente de quimioterapia opcional o adicional es un taxano. En otro aspecto particular, el agente de quimioterapia es ciclofosfamida.

En otro aspecto más, los usos médicos de la invención se modifican adicionalmente por la inclusión de la radioterapia.

El cáncer de pulmón es un ejemplo de cáncer. El medicamento puede estar libre de Rituxan y/o Campath, o (en algunos casos) cualquier otro agente farmacéuticamente activo además del anticuerpo anti-KIR y la proteína interleucina-21. La solicitud desvela anticuerpos anti-KIR que compiten con el AcM DF200 o 1-7F9. Además, desvela el anticuerpo anti-KIR 1-7F9. La solicitud desvela además un anticuerpo que no es 1-7F9, pero comprende el dominio VL y VH de 1-7F9. La solicitud desvela además un anticuerpo que no es 1-7F9, pero comprende las CDR de VL y VH de 1-7F9.

La invención también se refiere a una composición farmacéuticamente aceptable que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-KIR2DL con reactividad cruzada con KIR2DL1 y KIR2DL2/3 o fragmento de unión del mismo para su uso en el tratamiento del cáncer en combinación con una interleucina-21. La composición se puede caracterizar por cualquiera de las características descritas anteriormente con respecto al uso de la interleucina-21 y el anticuerpo anti-KIR (a saber, anti-KIR2DL con reactividad cruzada con KIR2DL1 y KIR2DL2/3) en la producción de

un medicamento para el tratamiento del cáncer.

Estos aspectos se describen más detalladamente en, y los aspectos, características y ventajas adicionales de la invención serán evidentes a partir de, la descripción de la invención proporcionada en el presente documento.

5

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra los resultados de los experimentos realizados con un anticuerpo NKCIR (el AcM anti-Ly49 (5E6) reacciona con el ortólogo de ratón de KIR) e interleucina-2 (IL-2), solo y en combinación, en un modelo de

10

cáncer de ratón. La Figura 2 muestra los resultados de los experimentos realizados en dos modelos de tumores de ratones cuando los ratones se trataron con anticuerpo anti-Ly49, IL-21 o ambos.

La Figura 3 muestra una alineación del dominio VL y las secuencias CDR de VR de los anticuerpos anti-KIR Pan-2D y DF200. (A) Alineación de las regiones variables de cadena ligera (VL) de DF200 (SEQ ID NO: 1) y Pan-2D (SEQ ID NO: 2). Los números sobre las secuencias de aminoácidos indican la posición respectiva para el inicio de la traducción Met (+1) en la inmunoglobulina inmadura (no secretada). (B) Alineación de secuencias CDR-L1. (C) Alineación de secuencias CDR-L2. (D) Alineación de secuencias CDR-L3.

15

La Figura 4 muestra las secuencias del dominio VH y las CDR de VH del anticuerpo anti-KIR DF200. (A) región VH del DF-200, proteína inmadura. La VH madura secretada comienza en la posición 20: resto Q. (B) CDR-H1. (C) CDR-H2. (D) CDR-H3.

20

La Figura 5 muestra las secuencias de los dominios VH y VL del anticuerpo anti-KIR 1-7F9. (A) Traducción de la cadena ligera variable madura de HuKIR 1-7F9. (B) Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera variable madura de HuKIR 1-7F9. (C) Traducción de la cadena pesada variable madura de HuKIR 1-7F9. (D) Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada madura de HuKIR 1-7F9.

25

Descripción de la invención

A menos que se establezca lo contrario o se contradiga claramente con el contexto, el término anticuerpo en el contexto de esta invención se refiere a una molécula de inmunoglobulina (Ig), un fragmento de una molécula de Ig o un derivado de cualquiera de los mismos que tiene la capacidad de (a) unirse específicamente a al menos un antígeno diana en condiciones fisiológicas características durante períodos de tiempo significativos y/o (b) modular una respuesta fisiológica asociada con su KIR diana, tal como la modulación de la actividad de las células NK moduladas con KIR. Un período de tiempo significativo a este respecto significa cualquier período adecuado para la detección del complejo anticuerpo-antígeno en un ensayo inmunológico estándar, tal como un ELISA. Normalmente, un período de tiempo significativo es un período de al menos aproximadamente 30 minutos, al menos aproximadamente 45 minutos, al menos aproximadamente una hora, al menos aproximadamente dos horas, al menos aproximadamente cuatro horas, al menos aproximadamente 8 horas, al menos aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas o más, aproximadamente 48 horas o más, etc.

30

35

40

Las inmunoglobulinas son una clase de proteínas relacionadas estructuralmente que comprenden cadenas pesadas (por ejemplo, cadenas α , Δ , ϵ , γ y μ) y cadenas ligeras (por ejemplo, cadenas k y λ). En los seres humanos, las inmunoglobulinas se pueden dividir en cinco clases principales (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) de acuerdo con las cuales las cadenas pesadas están contenidas en la molécula de Ig.

45

La estructura de las inmunoglobulinas está bien caracterizada. Véase, por ejemplo, *Fundamental Immunology* (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N. Y. (1989)). Las moléculas de IgG, el tipo más habitual de inmunoglobulina, comprenden dos pares de cadenas polipeptídicas, un par de cadenas ligeras (L), cadenas de bajo peso molecular y un par de cadenas pesadas (H), las cuatro interconectadas mediante enlaces disulfuro. En resumen, cada cadena pesada está compuesta normalmente por una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como HCVR o VH, por sus siglas en inglés) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende normalmente tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta normalmente por una región variable de cadena ligera (en el presente documento abreviada como LCVR o VL, por sus siglas en inglés) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende normalmente un dominio, CL. Las regiones VH y VL se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad (o regiones hipervariables, que pueden ser hipervariables en secuencia y/o en forma de bucles estructuralmente definidos), también llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDR, de sus siglas en inglés), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR, de sus siglas en inglés). En los anticuerpos de longitud completa, producidos naturalmente, cada VH y VL se compone normalmente de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (que también puede denominarse FR L1, CDR L1, etc. o bucle L1, L2, L3 en el dominio variable de cadena ligera y bucle H1, H2 y H3 en el dominio de cadena pesada en el caso de regiones de bucle hipervariables (véase, por ejemplo, Chothia y Lesk J. *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Normalmente, la numeración de restos de aminoácido en esta región se realiza por el método descrito en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) (frases como "numeración de restos de dominio variable como en Kabat" y "de acuerdo con Kabat" en el presente documento se refieren a este sistema de numeración para dominios variables de cadena

50

55

60

65

- pesada o dominios variables de cadena ligera). Utilizando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real de un péptido puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de, o inserción en, una FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una única inserción de aminoácido (resto 52a de acuerdo con Kabat) después del resto 52 de CDR H2 y restos insertados (por ejemplo, los restos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del resto 82 de la FR de cadena pesada. La numeración de Kabat de los restos puede determinarse para un anticuerpo dado por alineación en las regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "convencional".
- 10 Como se indicó anteriormente, un anticuerpo anti-KIR puede estar en forma de (o comprender) un "fragmento" de anticuerpo que retiene la capacidad de unirse específicamente a un KIR. Dichos fragmentos de anticuerpos se pueden caracterizar por poseer una cualquiera o una combinación de las características mencionadas anteriormente asociadas con los anticuerpos de longitud completa, discutidos en otra parte en el presente documento, en la medida apropiada (por ejemplo, muchos fragmentos de anticuerpos carecen de un dominio Fc y, por consiguiente, no inducen ni promueven funciones del complemento asociadas a anticuerpos. La función de unión a antígeno de los anticuerpos se puede realizar por cualquier número de fragmentos adecuados de los mismos. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste esencialmente en los dominios VL, VH, CL y CH I; (ii) fragmentos F(ab)₂ y F(ab')₂, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un enlace disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste esencialmente en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste esencialmente en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento de AcD (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que consiste esencialmente en un dominio VH; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite formarse como una sola cadena de proteína en la que las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como anticuerpos de cadena única Fv de cadena única (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Dichos anticuerpos de cadena única también están abarcados dentro de términos tales como fragmento de anticuerpo y péptido/molécula de tipo anticuerpo, a menos que se indique lo contrario o esté claramente indicado por el contexto. Otras formas de anticuerpos monocatenarios, tales como diacuerpos, también pretenden incluirse en estos términos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos, en los que los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena polipeptídica, pero utilizando un enlazador que normalmente es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, lo que obliga a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123; y Cao et al. (1998), Bioconjugate Chem. 9, 635-644). Aunque tienen propiedades de unión similares a los anticuerpos de longitud completa, dichos fragmentos de anticuerpos colectivamente y cada uno independientemente son características únicas de la invención, que exhiben diferentes propiedades y utilidades biológicas y/o fisicoquímicas que los anticuerpos. Estos y otros fragmentos de anticuerpos útiles y moléculas de tipo anticuerpos proporcionados por esta invención se discuten adicionalmente en el presente documento. En general, debe entenderse que cualquier fragmento de anticuerpo adecuado se puede utilizar como un sustituto de un anticuerpo en las composiciones y métodos de la invención descritos en el presente documento, y viceversa, a menos que se establezca lo contrario o se contradiga claramente con el contexto.
- 45 En un sentido general, el término anticuerpo incluye anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales (AcM). El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a una composición que comprende una población de anticuerpos homogénea que tiene una estructura y especificidad uniformes. Los anticuerpos policlonales normalmente proceden del suero de un animal que ha sido estimulado inmunogénicamente, pero también pueden proceder de tecnología recombinante. Los anticuerpos anti-KIR se pueden considerar anticuerpos monoclonales, independientemente de la forma en que se producen.
- 50 Un anticuerpo tal como se genera puede poseer cualquier isotipo y el anticuerpo puede cambiar de isotipo posteriormente utilizando técnicas convencionales que son bien conocidas en la técnica. Dichas técnicas incluyen el uso de técnicas recombinantes directas (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. 4.816.397), técnicas de fusión célula-célula (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. 5.916.771) y otras técnicas adecuadas conocidas en la técnica. Por consiguiente, por ejemplo, la función efectora de los anticuerpos multivalentes multiespecíficos provista por la invención puede "cambiarse" con respecto al isotipo de uno o ambos anticuerpos parentales mediante el cambio de isotipo a, por ejemplo, un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM para diversos usos terapéuticos.
- 60 Cabe señalar que los KIR son conocidos por varios alias, como se refleja aquí en la Tabla 1 y la Tabla 2:

Tabla 1 - Nomenclatura KIR

KIR	Nombre completo	Alias	ID de acceso
KIR2DL1	receptor tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, dos dominios, cola citoplásmica larga, 1	cl-42, nkat1, 47,11, p58.1, CD158a	L41267
KIR2DL2	receptor tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, dos dominios, cola citoplásmica larga, 2	cl-43, nkat6, CD158b1	L76669
KIR2DL3	receptor tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, dos dominios, cola citoplásmica larga, 3	cl-6, nkat2, nkat2a, nkat2b, p58, CD158b2	L41268
KIR2DL4	receptor tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, dos dominios, cola citoplásmica larga, 4	103AS, 15,212, CD158d	X97229
KIR2DL5A	receptor tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, dos dominios, cola citoplásmica larga, 5A	KIR2DL5.1, CD158f	AF217485
KIR2DL5B	receptor tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, dos dominios, cola citoplásmica larga, 5B	KIR2DL5.2, KIR2DL5.3, KIR2DL5.4	AF217486
KIR2DS1	receptor tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, dos dominios, cola citoplasmática corta, 1	EB6ActI, EB6ActII, CD158h	X89892
KIR2DS2	receptor tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, dos dominios, cola citoplasmática corta, 2	cl-49, nkat5, 183ActI, CD158j	L76667
KIR2DS3	receptor tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, dos dominios, cola citoplasmática corta, 3	nkat7	L76670
KIR2DS4	receptor tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, dos dominios, cola citoplasmática corta, 4	cl-39, KKA3, nkat8, CD158i	L76671
KIR2DS5	receptor tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, dos dominios, cola citoplasmática corta, 5	nkat9, CD158 g	L76672
KIR2DP1	receptor tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, dos dominios, pseudogén 1	KIRZ, KIRY, KIR15, KIR2DL6	AF204908
KIR3DL1	receptor tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, tres dominios, cola citoplásmica larga, 1	cl-2, NKB1, cl-11, nkat3, NKB1B, AMB11, KIR, CD158e1	L41269
KIR3DL2	receptor tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, tres dominios, cola citoplásmica larga, 2	cl-5, nkat4, nkat4a, nkat4b, CD158k	L41270
KIR3DL3	receptor tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, tres dominios, cola citoplásmica larga, 3	KIRC1, KIR3DL7, KIR44, CD158z	AF352324
KIR3DS1	receptor tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, tres dominios, cola citoplasmática corta, 1	nkat10, CD158e2	L76661
KIR3DP1	receptor tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, tres dominios, pseudogén 1	KIRX, KIR48, KIR2DS6, KIR3DS2P, CD158c	AF204919, AF204915- AF204917

Obtenido del sitio web del Comité de Nomenclatura de Hugo Gene, <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/kir.html>.

Tabla 2 - Nomenclatura KIR CD

Nombre habitual 1	Nombre habitual 2	Designación de CD
KIR3DL7	KIRC1	CD158z
KIR2DL2/13	p58.2/p58.3	CD158b1/b2
KIR2DL1	p58.1	CD158z
KIR2DS6	KIRX	CD158b1/b2
KIR2DL4	-	CD158c
KIR3DL1/S1	p70	CD158d
KIR2DL5	-	CD158e1/e2
KIR2DS5	-	CD158f
KIR2DS1	p50.1	CD158h
KIR2DS4	p50.3	CD158i
KIR2DS2	p50.2	CD158j
KIR3DL2	p140	Cd158k

Andre et al., Nature Immunol. 2(8):661 (2001).

5 Características funcionales de los anticuerpos anti-KIR

Los anticuerpos anti-KIR empleados en los usos médicos y composiciones de combinación de la invención (es decir, anticuerpo anti-KIR2DL con reactividad cruzada con KIR2DL1 y KIR2DL2/3) pueden clasificarse en función de las características funcionales, en particular con respecto a su capacidad de reacción cruzada o unión cruzada con más de un KIR, tal como más de un tipo de KIR inhibidor, y/o la capacidad de neutralizar eficazmente las señales inhibitoras de NK.

i. Reactividad cruzada con KIR

El término "KIR2DL2/3" se utiliza para referirse a los receptores KIR2DL2 y KIR2DL3. Estos dos receptores tienen una homología muy alta, son formas alélicas del mismo gen y son considerados por la técnica intercambiables en muchos aspectos. En consecuencia, KIR2DL2/3 se puede considerar en ciertos aspectos como una única molécula KIR inhibidora. Mientras que los anticuerpos anti-KIR que reaccionan de forma cruzada con KIR2DL2/3 se emplean en los usos médicos y las composiciones de combinación de la invención, los anticuerpos anti-KIR que tienen un perfil de unión a KIR que solo incluye KIR2DL2 y KIR2DL3 no se consideran "reacción cruzada"

Debido a que al menos uno de KIR2DL1 o KIR2DL2/3 está presente en al menos aproximadamente el 90 % de la población humana, los anticuerpos anti-KIR con reactividad cruzada con KIR2DL1 y KIR2DL2/3 pueden promover o mejorar la actividad de NK contra la mayoría de las células asociadas a alotipos HLA-C, respectivamente, alotipos HLA-C del grupo 2 y alotipos HLA-C del grupo 1. Una composición que comprende un único anticuerpo anti-KIR que tiene dicha reactividad cruzada se puede utilizar en el tratamiento y/o diagnóstico de la mayoría de los sujetos humanos, eliminando así la necesidad de perfiles genéticos del paciente y reduciendo la cantidad de anticuerpos diferentes que deben administrarse a un paciente para garantizar un resultado eficaz.

Los anticuerpos anti-KIR con reactividad cruzada pueden tener cualquier composición adecuada y se pueden obtener mediante una serie de técnicas adecuadas. Por ejemplo, un anticuerpo anti-KIR con reactividad cruzada puede comprender una cantidad de ligando KIR y/o secuencias de anticuerpos anti-KIR que se unen a diferentes KIR, que pueden estar asociadas mediante conjugación, multimerización o (en el caso de ligandos peptídicos) o estar comprendidas en una proteína de fusión. En otro aspecto, el anticuerpo anti-KIR comprende secuencias de anticuerpos anti-KIR de un anticuerpo anti-KIR con reactividad cruzada.

Se conocen anticuerpos anti-KIR con reactividad cruzada, a partir de los cuales se pueden obtener o derivar secuencias de unión a KIR. Un ejemplo de dicho anticuerpo se describe en, por ejemplo, Watzl et al., Tissue Antigens, 56, pág. 240 (2000). Otro ejemplo de dicho anticuerpo es el anticuerpo monoclonal NKVSF1, descrito en G. M. Spaggiara et al., Blood, 100, págs. 4098-4107 (2002), que se dice que reconoce un epítipo habitual de CD158a (KIR2DL1), CD158b (KIR2DL2) y p50.3 (KIR2DS4). El anticuerpo NKVSF1 (también conocido como AcM pan2D) está disponible en Serotec (Cergy Sainte-Christophe, Francia), referencia de catálogo n.º MCA2243. El anticuerpo monoclonal DF200, que reacciona con varios miembros de la familia KIR, incluidos KIR2DL1 y

KIR2DL2/3, es otro ejemplo de dicho anticuerpo. Un hibridoma que produce DF200 se ha depositado en la colección de cultivos CNCM, como n.º de identificación "DF200", n.º de registro CNCM I-3224, registrado el 10 de junio de 2004, Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos, Instituto Pasteur, 25, Rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15, Francia. Varios anticuerpos monoclonales adicionales se pueden generar y demostrar que son anticuerpos anti-KIR con reactividad cruzada.

Un anticuerpo anti-KIR con reactividad cruzada puede tener cualquier afinidad y/o avidéz adecuada para los dos o más KIR a los que se une. La afinidad se refiere a la fuerza de unión de un anticuerpo anti-KIR u otra proteína de unión a antígeno a un epítipo o determinante antigénico. Normalmente, la afinidad se mide en términos de una constante de disociación K_d , definida como $[Ab] \times [Ag] / [Ab-Ag]$ donde $[Ab-Ag]$ es la concentración molar del complejo anticuerpo-antígeno, $[Ab]$ es la concentración molar del anticuerpo no unido y $[Ag]$ es la concentración molar del antígeno no unido. La constante de afinidad K_a se define por $1/K_d$. Los métodos adecuados para determinar la especificidad y afinidad de péptidos de unión mediante inhibición competitiva, diálisis de equilibrio y similares se pueden encontrar en, por ejemplo, Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988; Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), y Muller, *Meth. Enzymol.* 92:589-601 (1983).

Normalmente, el anticuerpo anti-KIR tiene una afinidad por al menos un KIR en el intervalo de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^{10} M^{-1} (por ejemplo, aproximadamente 10^7 a aproximadamente 10^9 M^{-1}). El término inmunorreactivo en el presente documento se refiere normalmente a la unión de un anticuerpo anti-KIR a un KIR con una constante de disociación K_d inferior a aproximadamente 10^{-4} M . Por ejemplo, en un aspecto particular el anticuerpo anti-KIR tiene una constante de disociación media (K_D) de aproximadamente $7 \times 10^{-9} \text{ M}$ o más con respecto a KIR2DL1 y KIR2DL2/3, determinadas por, por ejemplo, el cribado de resonancia de plasmón de superficie (SPR, de sus siglas en inglés) (tal como mediante el análisis con un dispositivo analítico de SPR BIAcore™). En un aspecto a modo de ejemplo más particular, los anticuerpos anti-KIR tienen una K_D de aproximadamente $2 \times 10^{-9} \text{ M}$ (por ejemplo, aproximadamente $0,1 - 4 \times 10^{-9} \text{ M}$) o más para KIR2DL2/3 y aproximadamente $11 \times 10^{-9} \text{ M}$ (por ejemplo, aproximadamente $7-15 \times 10^{-9} \text{ M}$) o más para KIR2DL1.

La afinidad se puede determinar mediante cualquiera de los métodos descritos en otra parte del presente documento o sus equivalentes conocidos en la técnica. Un ejemplo de un método que se puede utilizar para determinar la afinidad se proporciona en el análisis de Scatchard de Munson & Pollard, *Anal. Biochem.* 107:220 (1980). La afinidad de unión también se puede determinar mediante métodos de equilibrio (por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA)) o análisis cinético (por ejemplo, análisis BIAcore™).

Los anticuerpos anti-KIR también, o alternativamente, se pueden caracterizar mediante la exhibición de la unión de KIR con una constante de disociación de menos de aproximadamente 100 nM, menos de aproximadamente 50 nM, menos de aproximadamente 10 nM, aproximadamente 5 nM o menos, aproximadamente 1 nM o menos, aproximadamente 0,5 nM o menos, aproximadamente 0,1 nM o menos, aproximadamente 0,01 nM o menos, o incluso aproximadamente 0,001 nM o menos.

La avidéz se refiere a la fuerza global de las interacciones totales entre una proteína de unión y un antígeno (por ejemplo, la fuerza total de las interacciones entre un anticuerpo anti-KIR y un KIR). La afinidad es la fuerza de las interacciones no covalentes totales entre un único sitio de unión a antígeno en un anticuerpo u otro péptido de unión y un único epítipo o determinante antigénico. La avidéz normalmente está regulada por tres factores principales: la afinidad intrínseca de la proteína de unión para el (los) epítipo(s) o determinante(s) antigénico(s) al que se une, la valencia del anticuerpo o proteína de unión y el antígeno (por ejemplo, un anticuerpo anti-KIR con una valencia de tres, cuatro o más normalmente exhibirá niveles más altos de avidéz por un antígeno que un anticuerpo bivalente y un anticuerpo bivalente tendrá una mayor avidéz por un antígeno que un anticuerpo univalente, especialmente cuando hay epítipos repetidos en el antígeno), y/o la disposición geométrica de los componentes que interactúan. La avidéz normalmente se mide con el mismo tipo de técnicas que se utilizan para evaluar la afinidad.

En otro aspecto, el anticuerpo anti-KIR reacciona de forma cruzada con KIR de dos o más especies. Por ejemplo, en un aspecto, el anticuerpo anti-KIR reacciona de forma cruzada con KIR de seres humanos y monos *cynomolgus*. En un aspecto particular, el anticuerpo anti-KIR reacciona de forma cruzada con al menos dos KIR humanos y también se une a las células NK de monos *cynomolgus*. Dicho anticuerpo anti-KIR puede comprender secuencias de o que proceden del anticuerpo NKVSF1, que exhibe dicho perfil de reactividad cruzada. Dichos anticuerpos anti-KIR se pueden someter a pruebas de toxicidad y otros estudios útiles en monos *cynomolgus*, si es necesario.

Los anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con varios KIR se pueden utilizar en las composiciones de combinación y usos médicos de la invención. Los ejemplos de perfiles de reactividad cruzada de dichos anticuerpos incluyen anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con KIR 2DL1 más 3DL1, 2DL1 más 3DL2, 2DL2/3 más 3DL1 y 2DL2/3 más 3DL2.

Por consiguiente, por ejemplo, el anticuerpo anti-KIR se une a KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 y reduce o bloquea la inhibición de la citotoxicidad de las células NK mediada por KIR, como se describe en, por ejemplo, el documento WO2005003168.

Los anticuerpos anti-KIR a modo de ejemplo comprenden una región VL que corresponde a la del anticuerpo anti-KIR DF200 o consisten esencialmente en dicha región VL (siendo sustancialmente similares y conservando un perfil de unión y afinidad similares) o una secuencia/dominio VL que es altamente similar (por ejemplo, al menos aproximadamente el 90 % idéntico o el 95 % idéntico) a la secuencia VL de DF200. La secuencia VL de DF200 se muestra en la Figura 3. Dichos anticuerpos anti-KIR también pueden definirse alternativamente comprendiendo el conjunto de CDR variables de cadena ligera de DF200 (también mostrado en la Figura 3). Dicho anticuerpo normalmente también comprenderá el dominio VH de DF200 o una secuencia altamente similar (por ejemplo, una secuencia que tiene una alta identidad con el dominio VH de DF200 o que consiste de otra manera esencialmente en dicha secuencia) o al menos las CDR variables de cadena pesada de DF200 (mostradas en la Figura 4).

Los anticuerpos anti-KIR a modo de ejemplo adicionales comprenden secuencias VH y VL que corresponden o son muy similares a (por ejemplo, consisten esencialmente en) las secuencias VH y VL del anticuerpo 1-7F9 (que se muestra en la Figura 5) o al menos comprende las CDR VL y VH de 1-7F9.

En otro aspecto, el anticuerpo anti-KIR compite con uno de estos anticuerpos o uno de los otros anticuerpos anti-KIR descritos en la bibliografía (por ejemplo, Pan-2D).

Los anticuerpos que compiten con los anticuerpos anti-KIR a modo de ejemplo, como DF200, 1-7F9 y/o NKVSF1, se pueden identificar utilizando ensayos de detección conocidos. Una serie de dichos ensayos se practican rutinariamente y son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 5.660.827). Los protocolos basados en, por ejemplo, ELISA, radioinmunoensayos, transferencia de Western y el uso del análisis BIACORE son adecuados para su uso en dichos estudios de competencia.

Se puede, por ejemplo, premezclar el anticuerpo de control (por ejemplo, DF200, NKVSF1 o 1-7F9) con cantidades variables del anticuerpo de prueba (por ejemplo, en relaciones de aproximadamente 1:1, 1:2, 1:10 o aproximadamente 1:100) durante un período de tiempo previo a la aplicación a una muestra de antígeno KIR. Como alternativa, el control y las cantidades variables de anticuerpo de prueba se pueden simplemente agregar por separado y mezclarse durante la exposición a la muestra de antígeno KIR. Siempre que se pueda distinguir los anticuerpos unidos de los libres (por ejemplo, mediante el uso de técnicas de separación o lavado para eliminar los anticuerpos no unidos) y controlar el anticuerpo del anticuerpo de prueba (por ejemplo, mediante el uso de anticuerpos secundarios específicos de especie o específicos de isotipo o específicamente mediante el marcaje del anticuerpo de control con un marcador detectable) se será capaz de determinar si el anticuerpo de prueba reduce la unión del anticuerpo de control a los diferentes antígenos KIR2DL, lo que indica que el anticuerpo de prueba reconoce sustancialmente el mismo epítipo que el control. La unión del anticuerpo de control (marcado) en presencia de un anticuerpo completamente irrelevante (que no se une a KIR) puede servir como valor alto de control. El valor bajo de control se puede obtener mediante la incubación del anticuerpo de control marcado con el mismo anticuerpo de control, pero sin marcar, donde se produciría la competencia y reduciría la unión del anticuerpo marcado. En un ensayo de prueba, una reducción significativa en la reactividad del anticuerpo marcado en presencia de un anticuerpo de prueba es indicativa de un anticuerpo de prueba que reconoce sustancialmente el mismo epítipo, es decir, uno que compite con el anticuerpo de control marcado. Por ejemplo, cualquier anticuerpo de prueba que reduzca la unión del anticuerpo de control a uno o ambos de los antígenos KIR2DL1 y KIR2DL3 en al menos aproximadamente el 50 %, tal como al menos aproximadamente el 60 % o más preferentemente al menos aproximadamente el 70 % (por ejemplo, aproximadamente el 65-100 %), en cualquier relación anticuerpo de control:de prueba entre aproximadamente 1:1 o 1:10 y aproximadamente 1:100 se considera un anticuerpo que compite con el control.

La competencia también se puede evaluar mediante, por ejemplo, citometría de flujo. En dicha prueba, las células que llevan un KIR dado se pueden incubar primero con un anticuerpo de control y luego con el anticuerpo de prueba marcado con un fluorocromo o biotina. Se dice que el anticuerpo compite con el anticuerpo de control si la unión obtenida en la preincubación con una cantidad saturada de anticuerpo de control es aproximadamente el 80 %, preferentemente aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 40 % o menos (por ejemplo, aproximadamente el 30 %) de la unión (como medida por medio de fluorescencia) de la obtenida por el anticuerpo de prueba sin preincubación con el anticuerpo de control. Como alternativa, se dice que un anticuerpo compite con el anticuerpo de control si la unión obtenida con un anticuerpo de control marcado (por un fluorocromo o biotina) en células preincubadas con una cantidad saturada de anticuerpo de prueba es de aproximadamente el 80 %, preferentemente aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 40 % o menos (por ejemplo, aproximadamente el 30 %) de la unión obtenida sin preincubación con el anticuerpo de prueba.

También se puede emplear ventajosamente un ensayo de competencia simple en el que un anticuerpo de prueba se preadsorbió y se aplicó a una concentración de saturación sobre una superficie sobre la cual se inmovilizaron KIR2DL1 o KIR2DL2/3 o ambos. La superficie en el ensayo de competencia simple es preferentemente un chip BIACORE (u otros medios adecuados para el análisis de resonancia de plasmones de superficie). Se mide la unión de un anticuerpo de control a la superficie recubierta con KIR. Esta unión a la superficie que contiene KIR del anticuerpo de control solo se compara con la unión del anticuerpo de control en presencia de un anticuerpo de prueba. Una reducción significativa en la unión a la superficie que contiene KIR2DL1 y KIR2DL2/3 por el anticuerpo de control en presencia de un anticuerpo de prueba indica que el anticuerpo de prueba reconoce sustancialmente el

mismo epítipo que el anticuerpo de control, de manera que el anticuerpo de prueba "compite" con el anticuerpo de control. Cualquier anticuerpo de prueba que reduzca la unión del anticuerpo de control a ambos de los antígenos KIR2DL1 y KIR2DL2/3 en al menos aproximadamente el 20 % o más, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 70 % o más, se puede considerar como un anticuerpo que compite con el anticuerpo de control. Preferentemente, dicho anticuerpo de prueba reducirá la unión del anticuerpo de control a cada uno de al menos los antígenos KIR2DL1, 2 y 3 en al menos aproximadamente el 50 % (por ejemplo, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 % o más). Se apreciará que el orden de los anticuerpos de control y de prueba se puede invertir, es decir, el anticuerpo de control se puede unir primero a la superficie y luego el anticuerpo de prueba se pone en contacto con la superficie posteriormente en un ensayo de competencia. Preferentemente, el anticuerpo que tiene mayor afinidad por los antígenos KIR2DL1 y KIR2DL2/3 se une primero a la superficie que contiene KIR2DL1 y KIR2DL2/3, ya que se espera que la disminución en la unión observada para el segundo anticuerpo (suponiendo que los anticuerpos compitan) será de mayor magnitud. Otros ejemplos de dichos ensayos se proporcionan en los Ejemplos en el presente documento, y en, por ejemplo, Saunal y Regenmortel, (1995) *J. Immunol. Methods* 183: 33-41.

La determinación de si un anticuerpo u otro agente se une a la misma o sustancialmente a la misma región epítipo que, por ejemplo, DF200, NKVSF1 o 1-7F9, puede llevarse a cabo utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica. En un ejemplo de métodos de mapeo/caracterización de epítopos, se puede determinar una región epítipo para un anticuerpo anti-KIR mediante la "huella" del epítipo utilizando la modificación química de las aminas/carboxilos expuestos en la proteína KIR2DL1 o KIR2DL2/3. Un ejemplo específico de dicha técnica de huella es el uso de intercambio de hidrógeno-deuterio detectado mediante espectrometría de masas (HXMS) en el que se produce un intercambio de hidrógeno/deuterio de protones de amida de la proteína del ligando y el receptor, la unión y el intercambio inverso, en el que los grupos amida de la cadena principal que participan en la unión de proteínas están protegidos de intercambio inverso y por lo tanto permanecerán deuterados. Las regiones relevantes se pueden identificar en este punto mediante proteólisis péptica, separación rápida por cromatografía líquida de alto rendimiento con microporos y/o espectrometría de masas de ionización por electronebulización. Véase, por ejemplo, Ehring H, *Analytical Biochemistry*, Vol. 267 (2) págs. 252-259 (1999) y/o Engen, J.R. y Smith, D.L. (2001) *Anal. Chem.* 73, 256A-265A. Otro ejemplo de una técnica de identificación de epítopos adecuada es el mapeo de epítopos por resonancia magnética nuclear (RMN), donde normalmente se compara la posición de las señales en los espectros de RMN bidimensional del antígeno libre y el antígeno que forman complejos con el péptido de unión al antígeno, tal como un anticuerpo. El antígeno normalmente se marca de forma isotópica y selectiva con ¹⁵N, de modo que solo se observan señales correspondientes al antígeno y ninguna señal del péptido de unión a antígeno en el espectro de RMN. Las señales de antígenos que se originan de los aminoácidos implicados en la interacción con el péptido de unión a antígeno normalmente cambiarán de posición en los espectros del complejo en comparación con los espectros del antígeno libre, y los aminoácidos implicados en la unión pueden identificarse de esa manera. Véase, por ejemplo, Ernst Schering Res Found Workshop. 2004;(44):149-67; Huang et al, *Journal of Molecular Biology*, Vol. 281 (1) págs. 61-67 (1998); y Saito y Patterson, *Methods*. Junio de 1996;9(3):516-24.

El mapeo/caracterización de epítopos también se puede realizar utilizando métodos de espectrometría de masas. Véase, por ejemplo, Downard, *J Mass Spectrom.* Abril de 2000;35(4):493-503 y Kiselar y Downard, *Anal Chem.* 1 de mayo de 1999;71(9):1792-801.

Las técnicas de digestión con proteasa también pueden ser útiles en el contexto del mapeo e identificación de epítopos. Las regiones/secuencias relevantes para el determinante antigénico se pueden determinar mediante digestión con proteasas, por ejemplo, mediante la utilización de tripsina en una relación de aproximadamente 1:50 a KIR2DL1 o KIR2DL2/3 o digestión a 37 °C y pH 7-8, seguido de un análisis de espectrometría de masas (MS) para la identificación de péptidos. Los péptidos protegidos de la escisión de tripsina por el anticuerpo anti-KIR se pueden identificar posteriormente mediante comparación de muestras sometidas a digestión con tripsina y muestras incubadas con anticuerpo y luego sometidas a digestión mediante, por ejemplo, tripsina (revelando así una huella del anticuerpo). Otras enzimas como quimotripsina, pepsina, etc., también o alternativamente se pueden utilizar en métodos similares de caracterización de epítopos. Por otra parte, la digestión enzimática puede proporcionar un método rápido para analizar si una posible secuencia determinante antigénica está dentro de una región de KIR2DL1 en el contexto de un agente de unión a KIR. Si el polipéptido no está expuesto a la superficie, lo más probable es que no sea relevante en términos de inmunogenicidad/antigenicidad. Véase, por ejemplo, Manca, *Ann Ist Super Sanita.* 1991;27(1): 15-9 para una discusión de técnicas similares.

La mutagénesis dirigida al sitio es otra técnica útil para la elucidación de un epítipo de unión. Por ejemplo, en el "escaneo de alanina", cada resto dentro de un segmento de proteína se reemplaza con un resto de alanina y se miden las consecuencias de la afinidad de unión. Si la mutación conduce a una reducción significativa en la afinidad de unión, lo más probable es que esté implicada en la unión. Se pueden utilizar anticuerpos monoclonales específicos para epítopos estructurales (es decir, anticuerpos que no se unen a la proteína desplegada) para verificar que el reemplazo de alanina no influye en el pliegue total de la proteína. Véase, por ejemplo, Clackson y Wells, *Science* 1995;267:383-386; y Wells, *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:1-6.

La microscopía electrónica también se puede utilizar para la "huella" del epítipo. Por ejemplo, Wang et al., *Nature* 1992;355:275-278 utilizó la aplicación coordinada de microscopios crioelectrónicos, la reconstrucción de imágenes

tridimensionales y la cristalografía de rayos X para determinar la huella física de un fragmento Fab en la superficie de la cápsida del virus del mosaico del caupí nativo.

5 Otras formas de ensayo "sin marcador" para la evaluación de epítomos incluyen la resonancia de plasmón de superficie (SPR, BIACORE) y la espectroscopia de interferencia reflectométrica (RifS). Véase, por ejemplo, Fägerstam et al., *Journal Of Molecular Recognition* 1990;3:208-14; Nice et al., *J. Chromatogr.* 1993;646:159-168; Leipert et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998;37:3308-3311; Kröger et al., *Biosensors and Bioelectronics* 2002;17:937-944.

10 Por supuesto, dichos anticuerpos a modo de ejemplo específicos (por ejemplo, DF200 y 1-7F9) también pueden incluirse en los usos o composiciones de la invención.

15 La solicitud también describe anticuerpos que no reaccionan de forma cruzada con más de un KIR. Por ejemplo, se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales específicos solo para KIR2DL1 bloquean las interacciones entre los alotipos HLA-Cw4 y KIR2DL1, así como los alotipos HLA-C similares que pertenecen al mismo grupo que Cw4 (Moretta et al., *J Exp Med.* 1993;178(2):597-604). En otro ejemplo, también se han descrito anticuerpos monoclonales contra KIR2DL2/3 que bloquean las interacciones de KIR2DL2/3 con alotipos HLACw3 (o similares) (Moretta et al., 1993, citado anteriormente). Opcionalmente, el anticuerpo se puede seleccionar del grupo que consiste en GL183 (específico de KIR2DL2/3/S2, disponible en Immunotech, Francia y Beckton Dickinson, EE.UU.); EB6 (específico de KIR2DL1/s1, disponible en Immunotech, Francia y Beckton Dickinson, EE.UU.); AZ138 (específico de KIR3DL1, disponible en Moretta et al, Univ. Genova, Italia); Q66 (específico de KIR3DL2, disponible en Immunotech, Francia); y DX9, Z27 (específico de KIR3DL1, disponible en Immunotech, Francia y Beckton Dickinson, EE.UU.).

25 **Neutralización de la inhibición de células NK asociadas a KIR**

Los anticuerpos anti-KIR también se pueden caracterizar basándose en su capacidad para bloquear o neutralizar la inhibición de NK y, por lo tanto, potenciar la actividad de las células NK contra las células diana bloqueadas. Como se indicó anteriormente, los anticuerpos anti-KIR que se unen a al menos un KIR durante un período de tiempo suficiente para la detección y/o para suministrar una "carga útil" a tejidos, células, etc. diana son importantes. Sin embargo, también son ventajosos los anticuerpos anti-KIR que neutralizan la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de las células NK en las células NK. Los anticuerpos anti-KIR pueden, por lo tanto, reaccionar de forma cruzada con dos o más KIR y neutralizar la actividad inhibitoria asociada con algunos o todos (normalmente preferentemente todos) los KIR asociados.

35 Si bien los anticuerpos anti-KIR con reacción cruzada se han informado en la bibliografía, al menos algunos de los anticuerpos anti-KIR con reacción cruzada que se conocen actualmente no parecen mostrar una potenciación de la actividad de las células NK (véase, por ejemplo, Watzl et al., *Tissue Antigens*, 56, pág. 240 (2000)). En consecuencia, dichos anticuerpos pueden ser de utilidad limitada con respecto a servir como un agente terapéutico adecuado para su uso en la mayoría de la población humana (al menos en su forma nativa no modificada). A este respecto, los anticuerpos anti-KIR que neutralizan la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de las células NK en células NK que expresan al menos uno de los al menos dos KIR diana diferentes asociados con los mismos representan un aspecto particularmente ventajoso.

45 Los anticuerpos anti-KIR neutralizantes pueden neutralizar parcial o totalmente la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de las células NK. La neutralización se refiere a cualquier bloqueo sustancial de señales inhibitorias presentes. La neutralización se puede medir mediante cualquier método adecuado. En un aspecto, la neutralización de la inhibición se refleja en que el(los) anticuerpo(s) anti-KIR neutralizantes causan al menos aproximadamente el 20 %, preferentemente al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 75 % o más (por ejemplo, aproximadamente el 25-100%) del aumento en la lisis específica mediada por células NK en una mezcla particular de células NK y diana NK en comparación con la cantidad de lisis específica que normalmente ocurre en un entorno sustancialmente idéntico sin la presencia del anticuerpo(s) anti-KIR. El porcentaje de aumento en este aspecto se puede determinar mediante, por ejemplo, la comparación con los resultados de los ensayos de toxicidad de liberación de cromo obtenidos de una mezcla de células diana NK y células NK que no bloquearon sus KIR asociados (100%) y una mezcla de células NK y células diana NK en la que las células diana NK presentan una molécula MHC de clase I afin para el KIR inhibitor en las células NK (0 %). En un aspecto, los anticuerpos anti-KIR inducen la lisis de la(s) célula(s) que no se lisarían eficazmente sin la presencia de dicho anticuerpo anti-KIR. Como alternativa, la neutralización de la actividad inhibitoria de KIR se puede indicar mediante, por ejemplo, los resultados de un ensayo de cromo que utiliza un clon de células NK o un transfectante que expresa uno o varios KIR inhibidores y una célula diana que expresa solo un alelo HLA reconocido por uno de los KIR en la célula NK, donde el nivel de citotoxicidad obtenido con el anticuerpo es al menos aproximadamente el 20 %, tal como al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 % o más (por ejemplo, aproximadamente el 25-100 %) de la citotoxicidad observada con una molécula anti-MHC de clase I conocida y administrada en un entorno sustancialmente idéntico, tal como el anticuerpo W6/32 anti-MHC de clase I (que actualmente está disponible en, por

ejemplo, Research Diagnostics, Flanders, NJ, EE.UU. y descrito en, por ejemplo, Shields et al., Tissue Antigens. Mayo de 1998;51(5):567-70).

Los ensayos de liberación de cromo y otros métodos para evaluar la actividad citolítica de células NK son conocidos en la técnica. Las condiciones adecuadas para dichos ensayos también son bien conocidas. Se realiza un ensayo típico de liberación de cromo mediante el marcaje de las células diana (por ejemplo, líneas celulares positivas Cw3 y Cw4, aproximadamente a, por ejemplo, 5000 células por pocillo en una placa de microtitulación) con $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (de manera que ^{51}Cr se lleva y retiene mediante células diana viables), el lavado para eliminar el exceso de radioactividad, luego la exposición a células NK durante un período de aproximadamente 4 horas en presencia o ausencia de anticuerpo(s) anti-KIR en una proporción adecuada de efector:diana (por ejemplo, aproximadamente 4:1) y la medición de los niveles subsiguientes de ^{51}Cr que reflejan la muerte y lisis de las células diana. Un ejemplo de dicho ensayo se describe en, por ejemplo, Moretta et al., 1993, J Exp Med 178, 597-604. En un ensayo similar, las células diana en proliferación se pueden marcar con ^3H -timidina, que se incorpora en el ADN de replicación. Tras la acción citolítica de las células NK, el ADN de las células diana se fragmenta y retiene rápidamente en un filtrado, mientras que el ADN grande no fragmentado se puede recolectar en un filtro, de modo que se puede medir la liberación de estos fragmentos o la retención de ^3H -timidina en el ADN celular. Otros ejemplos y discusiones relevantes relacionadas con dichos ensayos se pueden encontrar en, por ejemplo, Fridberg et al., Methods. Abril de 1996;9(2):316-26 y Motzer et al., Biological Research for Nursing, 2003, vol. 5, n.º 2, pág. 142-152 (11)). Otros ejemplos de ensayos de actividad citolítica de células NK también son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Vizier et al., Cytometry. 1 de marzo de 2002;47(3):158-62; Wahlberg et al., J Immunol Methods. 1 de julio de 2001;253(1-2):69-81; Zons et al., Clin Diagn Lab Immunol. Marzo de 1997; 4 (2): 202-207; Marcusson-Stahl et al., Toxicology. 1 de diciembre de 2003;193(3):269-79; Kantakamalakul et al., J Immunol Methods. 15 de enero de 2003;272(1-2):189-97; Lehmann et al., Cancer Immunol Immunother. Julio de 1999;48(4):209-13; Goldberg et al., J Immunol Methods. 22 de abril de 1999;224(1-2):1-9; Borella et al., J Immunol Methods. 12 de octubre de 1995;186(1):101-10; Lovgren et al., J Immunol Methods. 12 de julio de 1994;173(1):119-25; Dinota et al., J Immunol Methods. 10 de noviembre de 1988;114(1-2):53-9; y Hoshino et al., J Clin Lab Immunol. Septiembre de 1991;36(1):39-43). Por consiguiente, por ejemplo, se espera que las células NK KIR2DL1+ que muestran poca o ninguna actividad citolítica contra las células diana que expresan HLA-Cw4, muestren aumentos significativos en dicha actividad por medio de dichos ensayos cuando se les permita actuar en presencia de un anticuerpo anti-KIR que comprende secuencias de unión a KIR de o similares a DF200 y/o NKVSF1.

Los anticuerpos anti-KIR que se unen específicamente a los receptores humanos tanto KIR2DL1 como KIR2DL2/3 pueden revertir la inhibición de la citotoxicidad de las células NK mediada por estos KIR inhibidores. Los anticuerpos anti-KIR que comprenden secuencias de unión a KIR del anticuerpo DF200 son un ejemplo de dicha realización. Los anticuerpos anti-KIR neutralizantes pueden comprender secuencias de unión a KIR que son muy similares a las secuencias de unión a KIR de DF200 (por ejemplo, los anticuerpos anti-KIR comprenden secuencias de unión a KIR que son al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 % o más (por ejemplo, aproximadamente 55-99 %) idénticas a secuencias similares en DF200). En otro aspecto, un anticuerpo anti-KIR compite con el DF200 por unirse a sus KIR afines. En otro aspecto, el anticuerpo compite con el anticuerpo 1-7F9 por unirse a sus KIR afines. El DF200 o 1-7F9 y los anticuerpos procedentes de estos anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que comparten características con estos anticuerpos también se pueden utilizar en los usos médicos y composiciones de la invención.

En otro aspecto ejemplar, los anticuerpos anti-KIR inhiben específicamente la unión de moléculas MHC a receptores KIR. En un aspecto ejemplar, los anticuerpos anti-KIR inhiben específicamente la unión de las moléculas HLA-C a los receptores KIR2DL1 y KIR2DL2/3.

iii. Competencia con anticuerpos anti-KIR con reactividad cruzada y/o neutralizantes

En otro aspecto, los anticuerpos anti-KIR se pueden caracterizar por la capacidad de competir con anticuerpos anti-KIR con reactividad cruzada y/o neutralizantes para unirse a KIR afines y/o unirse a la misma región/epítipo determinante antigénico de tales como anticuerpos conocidos. Por ejemplo, el anticuerpo anti-KIR se caracteriza por su capacidad para competir con el anticuerpo NKVSF1 y/o el anticuerpo DF200.

La frase "compite con" cuando se refiere a un anticuerpo monoclonal particular (por ejemplo, DF200, NKVSF1, etc.) significa que el anticuerpo anti-KIR compite con el anticuerpo referenciado u otra molécula en un ensayo de unión que utiliza moléculas KIR recombinantes o moléculas KIR expresadas en la superficie. Por ejemplo, si un anticuerpo anti-KIR reduce de forma detectable la unión de DF200 a una molécula KIR normalmente unida por DF200 en un ensayo de unión, se puede decir que el anticuerpo anti-KIR "compite" con DF200. Un anticuerpo anti-KIR que "compite" con DF200 puede competir con DF200 para unirse al receptor humano KIR2DL1, al receptor humano KIR2DL2/3 o a ambos receptores humanos KIR2DL1 y KIR2DL2/3.

Aunque a menudo se relaciona, la descripción de una proteína en términos de competencia con una proteína de unión de referencia frente a la capacidad de la proteína para unirse al mismo, o sustancialmente similar, epítipo a la de una proteína de referencia en algunos casos implica propiedades biológicas y fisicoquímicas significativamente

- diferentes. La competencia entre las proteínas de unión implica que el anticuerpo anti-KIR de prueba se une a un epítipo que se superpone al menos parcialmente con un epítipo unido por un anticuerpo anti-KIR o está lo suficientemente cerca de dicho epítipo para que dicho anticuerpo anti-KIR compita con anticuerpos anti-KIR conocidos debido al impedimento estérico. Un gran anticuerpo anti-KIR, tal como un anticuerpo anti-KIR que
- 5 consiste en o comprende un anticuerpo, puede competir con un anticuerpo anti-KIR de referencia, sin unirse al mismo epítipo o similar debido al gran tamaño de los anticuerpos. Dicho anticuerpo anti-KIR competidor puede ser útil para bloquear interacciones asociadas con la misma región determinante antigénica que el anticuerpo anti-KIR de referencia, aunque se une a un determinante antigénico diferente.
- 10 En un aspecto ejemplar, el anticuerpo anti-KIR se une a los receptores humanos tanto KIR2DL1 como KIR2DL2/3, invierte la inhibición de la citotoxicidad de las células NK mediada por estos KIR y compite con el DF200 y/o NKVSF1 para unirse al receptor humano KIR2DL1, al receptor humano KIR2DL2/3 o a ambos receptores humanos KIR2DL1 y KIR2DL2/3.
- 15 En otro aspecto ejemplar, el anticuerpo anti-KIR se une a sustancialmente la misma región determinante antigénica que un anticuerpo anti-KIR, tal como DF200 y/o NKVSF1.

En otro aspecto ejemplar, los anticuerpos anti-KIR se unen a una o más proteínas KIR2DS, sin unirse a ningún receptor inhibidor KIR2DL.

- 20 La competencia se refiere a cualquier reducción significativa en la propensión a que una molécula particular se una a una pareja de unión particular en presencia de otra molécula que se una a la pareja de unión. Normalmente, la competencia significa una reducción de al menos aproximadamente el 15 % en la unión, tal como una reducción de al menos aproximadamente el 20 % en la unión (por ejemplo, una reducción en la unión de aproximadamente el 25 % o más, aproximadamente el 30 % o más, aproximadamente el 15-35 %, etc.) entre, por ejemplo, un anticuerpo anti-KIR y al menos un KIR en presencia de la molécula competidora, por ejemplo, un anticuerpo anti-KIR. En determinadas situaciones, tales como en los casos en que los epítopos que pertenecen a anticuerpos competidores están localizados cerca de un antígeno, la competencia puede estar marcada por una inhibición relativa superior a
- 25 aproximadamente el 40 % de la unión del receptor (por ejemplo, KIR), una inhibición de al menos aproximadamente el 50 %, una inhibición de al menos aproximadamente el 55 %, una inhibición de al menos aproximadamente el 60 %, una inhibición de al menos aproximadamente el 75 %, o un nivel más alto de inhibición (tal como un nivel de inhibición de aproximadamente el 45-95 %).

- La evaluación de la competencia implica normalmente una evaluación de la unión inhibitoria relativa utilizando una
- 35 primera cantidad de una primera molécula (por ejemplo, un anticuerpo anti-KIR); una segunda cantidad de una segunda molécula (por ejemplo, un anticuerpo anti-KIR conocido); y una tercera cantidad de una tercera molécula (por ejemplo, un KIR), en donde la primera, la segunda y la tercera cantidad son todas suficientes para realizar una comparación que imparte información sobre la selectividad y/o especificidad de las moléculas en cuestión con respecto a otras moléculas presentes. Normalmente, para los ensayos de competencia ELISA, se utilizan
- 40 aproximadamente 5-50 µg (por ejemplo, aproximadamente 10-50 µg, aproximadamente 20-50 µg, aproximadamente 5-20 µg, aproximadamente 10-20 µg, etc.) de un anticuerpo anti-KIR, un anticuerpo anti-KIR conocido y al menos un KIR para evaluar si existe competencia. Las condiciones también deben ser adecuadas para la unión de las moléculas competidoras a su diana posible/conocida. Las condiciones fisiológicas o casi fisiológicas (por ejemplo, temperaturas de aproximadamente 20-40 °C, pH de aproximadamente 7-8, etc.) pueden ser normalmente
- 45 adecuadas para el anticuerpo anti-KIR.

- La identificación de una o más moléculas que compiten con y/o que se unen a sustancialmente o esencialmente la misma región determinante antigénica o epítipo que un anticuerpo anti-KIR se puede determinar fácilmente utilizando cualquiera de varios ensayos de detección inmunológica en los que la competencia de anticuerpos puede
- 50 ser evaluada. Una serie de dichos ensayos se practican rutinariamente y son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. 5.660.827).

- La determinación de la competencia (o la inhibición relativa de la unión) entre dos o más moléculas se puede realizar mediante el uso de inmunoensayos en los que la molécula de unión a KIR de control (el anticuerpo DF200, por
- 55 ejemplo) y el anticuerpo anti-KIR de prueba se mezclan (o se adsorben previamente) y se aplican a una muestra que contiene KIR relevantes, tales como KIR2DL1 y KIR2DL2/3 (cada uno de los cuales se sabe que está unido mediante DF200). Los protocolos basados en ELISA, ensayos radioinmunitarios, transferencia de Western y similares son adecuados para su uso en dichos estudios de competencia. Los ELISA de competencia se realizan normalmente en condiciones adecuadas para la unión de las moléculas (por ejemplo, condiciones fisiológicas, particularmente en el caso de anticuerpos que se unen a epítopos conformacionales/no lineales).
- 60

- La competencia también se puede evaluar mediante, por ejemplo, una prueba de citometría de flujo. En dicha prueba, las células que llevan un KIR dado se pueden incubar primero con un anticuerpo anti-KIR u otra proteína de unión a KIR (DF200, por ejemplo) y luego con un anticuerpo anti-KIR marcado con un fluorocromo o biotina. Se
- 65 puede decir que el anticuerpo anti-KIR compite con el DF200 si la unión obtenida en la preincubación con una cantidad saturada de DF200 es aproximadamente el 80 % o menos, tal como aproximadamente el 50 % o menos,

aproximadamente el 40 % o menos (por ejemplo, aproximadamente el 30 % o menos) o cualquier otra cantidad adecuada (por ejemplo, aproximadamente 15-95 %) de la unión a KIR por el anticuerpo anti-KIR (medido por medio de fluorescencia) sin preincubación con DF200. Como alternativa, se puede decir que un anticuerpo anti-KIR compite con un anticuerpo anti-KIR conocido, tal como DF200, si la unión obtenida con un anticuerpo marcado (mediante un fluorocromo o biotina) en células preincubadas con una cantidad saturada de un anticuerpo anti-KIR es aproximadamente el 80 % o menos, tal como menos de aproximadamente el 50 %, menos de aproximadamente el 40 % o menos (por ejemplo, aproximadamente el 30 % o menos) o cualquier otra cantidad adecuada (por ejemplo, aproximadamente 15-95 %) de la unión obtenida por el anticuerpo anti-KIR marcado sin preincubación con el anticuerpo anti-KIR.

La competencia también o alternativamente se puede evaluar mediante el análisis SPR. En dicho ensayo, los KIR relevantes (por ejemplo, KIR2DL1 y/o KIR2DL2/3) se inmovilizan en la superficie de un chip BIAcore (u otros medios adecuados para el análisis de resonancia de plasmón de superficie). El anticuerpo de control (por ejemplo, DF200) se pone luego en contacto con la superficie a una concentración de saturación y se mide la unión KIR del anticuerpo de control. Esta unión del anticuerpo de control se compara con la unión del anticuerpo de control a la superficie unida a KIR en presencia del anticuerpo anti-KIR de prueba. En un ensayo de prueba, una reducción significativa en la unión de la superficie que contiene KIR por el anticuerpo de control en presencia de un anticuerpo de prueba indica que el anticuerpo anti-KIR de prueba reconoce sustancialmente el mismo epítipo que el anticuerpo de control, de manera que el anticuerpo anti-KIR de prueba "compite" con el anticuerpo de control. Se apreciará que el orden de la reacción del anticuerpo de control y el anticuerpo anti-KIR de prueba con los KIR inmovilizados se puede revertir: es decir, el anticuerpo de control se puede unir primero a la superficie y el anticuerpo anti-KIR de prueba se puede poner en contacto con la superficie a partir de entonces en un ensayo de competencia. Preferentemente, la molécula que se cree que tiene mayor afinidad por KIR se une primero a la superficie, ya que se esperará que la disminución en la unión observada para la segunda molécula sea de mayor magnitud. Otros ejemplos de dichos ensayos se proporcionan en, por ejemplo, Saunal y Regenmortel, (1995) *J. Immunol. Methods* 183: 33-41. Normalmente, los niveles de competencia adecuados (por ejemplo, un 15-85 % o menos de unión de una molécula en presencia de la molécula competitiva) se describen anteriormente y se pueden aplicar en general a los métodos de ensayo de competencia descritos en el presente documento.

Métodos adicionales para determinar la especificidad de AcM mediante la inhibición competitiva son conocidos en la técnica y se pueden encontrar ejemplos útiles de dichas técnicas en, por ejemplo, Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988), Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), Ausubel et al., Eds., *Short Protocols in Molecular Biology*, (5ª edición), John Wiley & Sons (2002), y Muller, *Meth. Enzymol.* 92:589-601 (1983).

Una región determinante antigénica o epítipo se puede identificar mediante una serie de técnicas conocidas. Por ejemplo, una región determinante antigénica se puede identificar rápidamente mediante ensayos de "huella", tales como a través de una modificación química de las aminas/carboxilos expuestos en KIR diana, tales como en las proteínas KIR2DL1 o KIR2DL2/3. Un ejemplo específico de dicha técnica de huella es el uso de HXMS, en donde se produce un intercambio de hidrógeno/deuterio de protones de amida de proteína de receptor y ligando, la unión y el intercambio inverso, en el que los grupos amida de la cadena principal que participan en la unión de proteínas están protegidos de intercambio inverso y por lo tanto permanecerán deuterados. Las regiones relevantes se pueden identificar en este punto mediante proteólisis péptica, separación rápida por cromatografía líquida de alto rendimiento con microporos y/o espectrometría de masas de ionización por electronebulización. Véase, por ejemplo, Ehring H, *Analytical Biochemistry*, Vol. 267 (2) págs. 252-259 (1999) y/o Engen, J.R. y Smith, D.L. (2001) *Anal. Chem.* 73, 256A-265A.

Otro ejemplo de una técnica de identificación de epítopos adecuada es el mapeo de epítopos de resonancia magnética nuclear (RMN), donde normalmente la posición de las señales en los espectros de RMN bidimensional del antígeno libre y el antígeno que forman complejos con el péptido de unión al antígeno, tal como un anticuerpo, se compara. El antígeno normalmente se marca de forma isotópica y selectiva con ¹⁵N, de modo que solo se observan señales correspondientes al antígeno y ninguna señal del péptido de unión a antígeno en el espectro de RMN. Las señales de antígenos que se originan de los aminoácidos implicados en la interacción con el péptido de unión a antígeno normalmente cambiarán de posición en los espectros del complejo en comparación con los espectros del antígeno libre, y los aminoácidos implicados en la unión pueden identificarse de esa manera. Véase, por ejemplo, Ernst Schering Res Found Workshop. 2004;(44):149-67; Huang et al, *Journal of Molecular Biology*, Vol. 281 (1) págs. 61-67 (1998); y Saito y Patterson, *Methods*. Junio de 1996;9(3):516-24.

El mapeo/caracterización de epítopos también se puede realizar utilizando métodos de espectrometría de masas. Véase, por ejemplo, Downard, *J Mass Spectrom.* Abril de 2000;35(4):493-503 y Kiselar y Downard, *Anal Chem.* 1 de mayo de 1999;71(9):1792-801.

Las técnicas de digestión con proteasa también pueden ser útiles en el contexto del mapeo e identificación de epítopos. Las regiones/secuencias relevantes para el determinante antigénico se pueden determinar mediante digestión con proteasas, por ejemplo, mediante la utilización de tripsina en una relación de aproximadamente 1:50 a

KIR2DL1 o KIR2DL2/3 o digestión a 37 °C y pH 7-8, seguido de una análisis de espectrometría de masas (MS) para la identificación de péptidos. Los péptidos protegidos de la escisión de tripsina por el aglutinante anti-KIR se pueden identificar posteriormente mediante comparación de muestras sometidas a digestión con tripsina y muestras incubadas con anticuerpo y luego sometidas a digestión mediante, por ejemplo, tripsina (revelando así una huella del aglutinante). Otras enzimas como quimotripsina, pepsina, etc., también o alternativamente se pueden utilizar en métodos similares de caracterización de epítomos. Por otra parte, la digestión enzimática puede proporcionar un método rápido para analizar si una posible secuencia determinante antigénica está dentro de una región del KIR2DL1 en el contexto de un polipéptido anti-KIR que no está expuesto a la superficie y, por consiguiente, lo más probable es que no sea relevante en términos de antigenicidad. Véase, por ejemplo, Manca, *Ann Ist Super Sanita.* 1991;27(1):15-9 para una discusión de técnicas similares.

También se pueden utilizar varias técnicas de presentación de fagos para identificar epítomos. Véase, por ejemplo, Wang y Yu, *Curr Drug Targets.* Enero de 2004;5(1):1-15; Burton, *Immunotechnology.* Agosto de 1995;1(2):87-94; Cortese et al., *Immunotechnology.* Agosto de 1995;1(2):87-94; e Irving et al., *Curr Opin Chem Biol.* Junio de 2001;5(3):314-24. Los epítomos de consenso también se pueden identificar a través de técnicas modificadas relacionadas con la visualización de fagos (véase, Mumei et al., *J. Comput. Biol.* 10:555-567 y Mumei, *Proceedings of the Sixth Annual International Conference on Computational Molecular Biology (RECOMB-02)*, pág. 233-240 (ACM Press, New York)) para discusión (véase también Bailey et al., *Protein Science* (2003), 12:2453-2475; Dromey et al., *J Immunol.* 1 de abril de 2004;172(7):4084-90; Parker et al., *Mol Biotechnol.* Enero de 2002;20(1):49-62; y Czompoly et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 8 de agosto de 2003;307(4):791-6).

El mapeo de epítomos mediante unión competitiva a un KIR con dos moléculas de unión a KIR donde una está biotinilada (por ejemplo, un anticuerpo anti-KIR conocido) o de otra manera similar, es otro método para identificar regiones determinantes antigénicas relevantes.

Otros métodos potencialmente útiles para mapear epítomos incluyen técnicas de cristalografía, técnicas de difracción de rayos X (tales como las técnicas de estudio de difracción/secuencia de rayos X desarrolladas por Poljak y otros en la década de 1970-1980) y la aplicación de la tecnología de síntesis de péptidos multipin.

Los métodos basados en ordenador, como el análisis de secuencias y el análisis de estructura tridimensional y el acoplamiento también se pueden utilizar para identificar determinantes antigénicos. Por ejemplo, un epítomo también se puede determinar mediante modelado molecular utilizando una estructura de un KIR o una porción del mismo con acoplamiento de la estructura del fragmento Fab de un AcM individual. Cuando sea necesario, los modelos de KIR se pueden producir mediante modelos de homología con KIR caracterizados por la estructura utilizando programas como el MOE (entorno operativo molecular), que está disponible en Chemical Computing Group (Montreal, Quebec, Canadá - www.chemcomp.com). Estos y otros métodos de mapeo se discuten en *Epitope Mapping A Practical Approach* (Westwood y Hay Eds.) 2001 Oxford University Press (véase también, Cason, *J Virol Methods.* Septiembre de 1994;49(2):209-19).

En aspectos adicionales, los anticuerpos anti-KIR se dirigen a regiones antigénicas particulares y/o epítomos presentados en varios KIR. En un aspecto ejemplar, los anticuerpos anti-KIR se unen específicamente a KIR2DL1 dentro de una región definida por uno o más de los restos de aminoácidos seleccionados de 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 127, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 181 y 192. En otra realización, los anticuerpos anti-KIR se unen específicamente a KIR2DL1 y KIR2DL2/3 dentro de una región definida por uno o más de los restos de aminoácidos 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 127, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 181 y 192 de los mismos.

En un aspecto adicional, los anticuerpos anti-KIR se unen a KIR2DL1, pero se unen a un mutante de KIR2DL1 en el que R131 es Ala con una afinidad de unión significativamente reducida en relación con el mismo (aproximadamente el 20 % o menos, aproximadamente el 30 % o menos, aproximadamente el 40 % o menos, aproximadamente el 50 % o menos, aproximadamente el 60 % o menos, aproximadamente el 70 % o menos, etc., de la afinidad exhibida para KIR2DL1). En otro aspecto, los anticuerpos anti-KIR se unen a KIR2DL1 pero se unen a un mutante de KIR2DL1 en el que R157 es Ala con una afinidad de unión relativamente reducida (aproximadamente el 20 % o menos, aproximadamente el 30 % o menos, aproximadamente el 40 % o menos, aproximadamente el 50 % o menos, aproximadamente el 60 % o menos, aproximadamente el 70 % o menos, etc., de la afinidad exhibida para KIR2DL1). En otro aspecto, los anticuerpos anti-KIR se unen a KIR2DL1 y se unen a un mutante de KIR2DL1 en el que R158 es Ala con una afinidad de unión relativamente reducida (aproximadamente el 20 % o menos, aproximadamente el 30 % o menos, aproximadamente el 40 % o menos, aproximadamente el 50 % o menos, aproximadamente el 60 % o menos, aproximadamente el 70 % o menos, etc., de la afinidad exhibida para KIR2DL1).

En un aspecto adicional, los anticuerpos anti-KIR se unen a los restos 131, 157 y 158 de KIR2DL1.

En un aspecto adicional, los anticuerpos anti-KIR se unen a KIR2DS3(R131W), pero no a KIR2DS3 de tipo silvestre. En otro aspecto más, los anticuerpos anti-KIR se unen a KIR2DL1 y KIR2DL2/3, así como a KIR2DS4. En otro aspecto más, los anticuerpos anti-KIR se unen tanto a KIR2DL1 como a KIR2DL2/3, pero no a KIR2DS4.

Para ilustrar el uso de secuencias de anticuerpos anti-KIR en la composición y construcción de anticuerpos anti-KIR, se describirán secuencias de anticuerpos anti-KIR a modo de ejemplo y variantes de secuencias de anticuerpos.

- 5 En un aspecto ejemplar, el anticuerpo anti-KIR comprende una secuencia CDR-L1 que consiste o consiste esencialmente en la secuencia Lys Ala Ser Gln Asn Val Val Thr Tyr Val Ser (SEQ ID NO: 1). En otro aspecto, el anticuerpo anti-KIR comprende una CDR-L1 que consiste o consiste esencialmente en la secuencia Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Tyr (SEQ ID NO: 2).
- 10 En otro aspecto ilustrativo, el anticuerpo anti-KIR también, o alternativamente, comprende una secuencia CDR-L2 que consiste o consiste esencialmente en la secuencia Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr (SEQ ID NO: 3). En un aspecto adicional, el anticuerpo anti-KIR también, o alternativamente, comprende una secuencia CDR-L2 que consiste o consiste esencialmente en la secuencia Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser (SEQ ID NO:4).
- 15 En otra faceta demostrativa, el anticuerpo anti-KIR también, o alternativamente, comprende una secuencia CDR-L3 que consiste o consiste esencialmente en la secuencia Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Phe Tyr Thr (SEQ ID NO:5). En otro aspecto más, el anticuerpo anti-KIR también, o alternativamente, comprende una CDR-L3 que consiste o consiste esencialmente en la secuencia His Gln Tyr His Arg Ser Pro Pro Thr (SEQ ID NO:6).
- 20 Como otra característica ejemplar, el anticuerpo anti-KIR comprende una CDR-H1 que consiste o consiste esencialmente en la secuencia Gly Phe Ser Phe Thr Phe Tyr Gly Val His (SEQ ID NO: 7).
- En aún otro aspecto ejemplar, el anticuerpo anti-KIR comprende una CDR-H2 que consiste o consiste esencialmente en la secuencia Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser (SEQ ID NO: 8).
- 25 En aún otro aspecto ejemplar, el anticuerpo anti-KIR comprende una CDR-H3 que consiste o consiste esencialmente en la secuencia Asn Pro Arg Pro Gly Asn Tyr Pro Tyr Gly Met Asp Tyr (SEQ ID NO:9).
- En un aspecto diferente, el anticuerpo anti-KIR comprende una CDR-H1 que consiste o consiste esencialmente en la secuencia Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His (SEQ ID NO:10).
- 30 En un aspecto adicional, el anticuerpo anti-KIR comprende una CDR-H2 que consiste o consiste esencialmente en la secuencia Thr Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly (SEQ ID NO:11).
- Otro anticuerpo anti-KIR comprende una CDR-H3 que consiste o consiste esencialmente en la secuencia Pro Thr Thr Ala Thr Arg Ser Ser Ala Met Asp Tyr (SEQ ID NO:12).
- 35 Las propiedades básicas y novedosas de estas secuencias CDR son la capacidad de, en combinación con otras secuencias necesarias CDR y FR, unirse al epítipo presentado en uno o más KIR. Como se indicó anteriormente, puede darse el caso de que determinados restos en dichas secuencias contribuyan poco o nada a la unión al epítipo de KIR. Por otra parte, también, o alternativamente, puede darse el caso de que dichas secuencias CDR puedan tolerar una o unas pocas inserciones sin afectar sustancialmente sus características de unión al epítipo (especificidad y/o afinidad). Sin embargo, se pueden hacer cambios significativos en dichas secuencias para producir variantes útiles. Dichos cambios se discuten más adelante.
- 40 Estas secuencias CDR a modo de ejemplo se pueden combinar entre sí, con las secuencias CDR variantes descritas a continuación u otras CDR anti-KIR (normalmente de anticuerpos anti-KIR de unión a KIR). En un aspecto ejemplar, el anticuerpo anti-KIR comprende la mayoría o todas las secuencias CDR seleccionadas de las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 8 y 9.
- 50 En otro aspecto ilustrativo, el anticuerpo comprende una secuencia variable de cadena ligera (VL) que consiste esencialmente en la secuencia Met Glu Ser Gln Thr Leu Val Phe Ile Ser Ile Leu Leu Trp Leu Tyr Gly Ala Asp Gly Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Asn Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys Arg (SEQ ID NO:13). Las propiedades básicas y novedosas de dicha secuencia son su contribución a la unión de KIR. Puede ser posible que algunos aminoácidos puedan ser eliminados, agregados o sustituidos en esta secuencia sin un impacto sustancial en dichas propiedades.
- 60 En un aspecto a modo de ejemplo adicional, el anticuerpo comprende una secuencia VL que consiste esencialmente en la secuencia Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Met Ser Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg (SEQ ID NO:14).
- 65

La porción N-terminal de la SEQ ID NO: 13 y la SEQ ID NO: 14 se pueden escindir en una célula hospedadora adecuada si la secuencia se presenta en un contexto apropiado (por ejemplo, los primeros aproximadamente 23 aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 se pueden escindir después de actuar como una secuencia señal para la secuencia VL en la que es el contenido completo del péptido en cuestión o representa una porción N-terminal expuesta de un péptido). En consecuencia, los anticuerpos anti-KIR pueden comprender secuencias VL que consisten esencialmente en versiones truncadas N-terminales de la SEQ ID NO: 13 y la SEQ ID NO: 14 (por ejemplo, cuando se han eliminado aproximadamente 20 aminoácidos de la porción N-terminal de la misma).

En otro aspecto, el anticuerpo anti-KIR también, o alternativamente, comprende una secuencia variable de cadena pesada (VH) que consiste esencialmente en la secuencia Met Ala Val Leu Gly Leu Leu Phe Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Phe Thr Pro Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Val Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Pro Gly Asn Tyr Pro Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO:15). Los primeros 20 restos de aminoácidos de esta secuencia pueden actuar como una secuencia señal para un péptido que consiste o consiste esencialmente en esta secuencia o una cadena de proteínas que comprende esta secuencia posicionada en un contexto apropiado. En consecuencia, el anticuerpo anti-KIR puede comprender una secuencia VH que consiste esencialmente en un fragmento de la SEQ ID NO: 15 que carece de los primeros aproximadamente 1-20 restos de la misma.

En otro aspecto, el anticuerpo anti-KIR también, o alternativamente, comprende una secuencia variable de cadena pesada (VH) que consiste esencialmente en la secuencia Met Glu Cys Asn Trp Ile Leu Pro Phe Ile Leu Ser Val Thr Ser Gly Val Tyr Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr V Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Met Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser S Leu Thr Asn Glu D Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Pro Thr Thr Ala Thr Arg Ser Ser Ala Met D Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO:16). Los primeros 20 restos de aminoácidos de esta secuencia pueden actuar como una secuencia señal para un péptido que consiste o consiste esencialmente en esta secuencia o una cadena de proteínas que comprende esta secuencia posicionada en un contexto apropiado. En consecuencia, el anticuerpo anti-KIR puede comprender una secuencia VH que consiste esencialmente en un fragmento de la SEQ ID NO: 16 que carece de los primeros aproximadamente 1-20 restos de la misma.

En un aspecto, el anticuerpo anti-KIR comprende una secuencia VL que consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 13 o una porción truncada N-terminal de la misma y una secuencia VH que consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 15 o una porción truncada N-terminal de la misma.

Como ya se ha mencionado, las variantes de secuencia adecuadas de las secuencias de anticuerpos de unión a antígeno, tales como las secuencias de anticuerpos anti-KIR, se pueden incorporar en los anticuerpos descritos en el presente documento. Las variaciones en la mayoría de los tipos de secuencia de anticuerpos pueden ser adecuadas. Por consiguiente, por ejemplo, un anticuerpo anti-KIR puede comprender secuencias constantes variantes y/o secuencias marco variantes.

En un aspecto, el anticuerpo anti-KIR comprende una o más secuencias CDR variantes (es decir, una secuencia CDR que difiere de una secuencia CDR de tipo silvestre similar por una o más inserciones, deleciones, adiciones y/o sustituciones de aminoácidos que afectan las propiedades biológicas y/o fisicoquímicas de la secuencia con respecto a su secuencia relativa de tipo silvestre). Hay una serie de técnicas conocidas para generar variantes de CDR, cualquier técnica o combinación adecuada de las cuales puede utilizarse en el contexto de esta invención. Los ejemplos de dichas técnicas incluyen la eliminación de restos no esenciales como se describe en, por ejemplo, Studnicka et al., Protein Engineering, Vol 7, 805-814 (1994) (véase también Soderlind et al., Immunotechnology, Marzo de 1999;4(3-4):279-85), mutagénesis ambulante de CDR y otras técnicas de maduración de afinidad artificial (véase, por ejemplo, Journal of Molecular Biology, diciembre de 1995;254(3):392-403), técnicas de combinación de CDR en donde normalmente las CDR se amplifican de un conjunto diverso de plantillas de genes que comprenden opcionalmente oligonucleótidos sintéticos, las regiones constantes de VL, VH y/o CDR se amplifican y los diversos fragmentos se mezclan (en formato de cadena única o de doble cadena) y se ensamblan mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de sus siglas en inglés) para producir un conjunto de productos genéticos que codifican fragmentos de anticuerpos que llevan CDR barajadas introducidas en el marco maestro, que se amplifica utilizando cebadores externos que se hibridan a sitios más allá de los sitios de restricción insertados para asegurar la producción de productos de longitud completa, que se insertan en un vector de elección y se utilizan para expresar proteínas variantes que contienen CDR. La estructura apropiada se puede determinar mediante la superposición de las estructuras variante/mimética y las de las secuencias originales, por ejemplo, mediante la comparación de las estructuras de la solución de RMN. Ejemplos adicionales de dichos métodos se proporcionan en otro lugar en el presente documento.

Las variantes de secuencias CDR, VH y VL pueden exhibir cualquier nivel adecuado de identidad para una o más secuencias CDR, VH y VL "originales", respectivamente, tales como las secuencias CDR, VH y VL del AcM anti-KIR DF200 y/o AcM anti-KIR NKVSF1. Normalmente, una secuencia variante que se une a una región determinante

- antigénica esencialmente idéntica como original conservará al menos aproximadamente el 40 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia original, tal como aproximadamente el 50 % o más, aproximadamente el 60 % o más, aproximadamente el 70 % o más, aproximadamente el 75 % o más, aproximadamente el 80 % o más, aproximadamente el 85 % o más, aproximadamente el 90 % o más, o al menos aproximadamente el 95 % (por ejemplo, aproximadamente el 45-99 %, aproximadamente el 55-99 % o aproximadamente el 65-99 %) de identidad con la secuencia original. Sin embargo, en algunos casos, particularmente con respecto a las secuencias CDR dirigidas a un epítipo esencialmente idéntico, pueden ser adecuadas variantes con niveles de identidad incluso más bajos.
- 10 Las variantes de secuencia CDR, VH y VL que se unen a diferentes regiones determinantes antigénicas o un conjunto diferente (o "perfil") de regiones determinantes antigénicas también se pueden generar mediante cualquiera de las técnicas descritas en otra parte en el presente documento (diseño racional, mutagénesis, evolución dirigida, etc.). En dichos casos, se pueden esperar niveles significativamente más bajos de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a una secuencia original. Por ejemplo, en el contexto de una variante CDR-L1, CDR-H1,
- 15 CDR-H2 o CDR H3 que tiene un perfil de unión a epítipo diferente de una secuencia original, tan solo aproximadamente el 20-30 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a una secuencia CDR original puede exhibirse en variantes que contribuyen a la unión de NKCAMR, tales como KIR.
- Normalmente, las variantes difieren de las secuencias "originales" principalmente a través de sustituciones conservadoras; por ejemplo, al menos aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 50 % o más, aproximadamente el 60 % o más, aproximadamente el 70 % o más, aproximadamente el 75 % o más, aproximadamente el 80 % o más, aproximadamente el 85 % o más, aproximadamente el 90 % o más, aproximadamente el 95 % o más (por ejemplo, aproximadamente el 65-99 %) de las sustituciones en la variante son reemplazos conservadores de restos de aminoácidos. En el contexto de la presente invención, las sustituciones conservadoras se pueden definir mediante sustituciones dentro de las clases de aminoácidos reflejadas en una o
- 20 más de las siguientes tres tablas:
- 25

Tabla 4 - Clases de restos de aminoácidos para sustituciones conservadoras

Clase de aminoácidos	Restos de aminoácidos
Restos Ácidos	ASP y GLU
Restos básicos	LYS, ARG e HIS
Restos hidrófilos no cargados	SER, THR, ASN y GLN
Restos alifáticos no cargados	GLY, ALA, VAL, LEU e ILE
Restos no polares no cargados	CYS, MET y PRO
Restos aromáticos	PHE, TYR y TRP

30 Tabla 5 - Grupos alternativos de sustituciones conservadoras de restos de aminoácidos

	Alanina (A)	Serina (S)	Treonina (T)
	Ácido aspártico (D)	Ácido glutámico (E)	
	Asparagina (N)	Glutamina (Q)	
	Arginina (R)	Lisina (K)	
	Isoleucina (I)	Leucina (L)	Metionina (M)
	Fenilalanina (F)	Tirosina (Y)	Triptófano (W)

Tabla 6 - Otras clasificaciones físicas y funcionales alternativas de los restos de aminoácidos

Restos que contienen grupo alcohol	S y T
Restos alifáticos	I, L, V y M
Restos asociados a cicloalqueno	F, H, W e Y
Restos hidrófobos	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W e Y
Restos cargados negativamente	D y E
Restos polares	C, D, E, H, K, N, Q, R, S y T
Restos pequeños	A, C, D, G, N, P, S, T y V

(continuación)

Restos muy pequeños	A, G y S
Restos implicados en la formación de giros	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P y T
Restos flexibles	E, Q, T, K, S, G, P, D, E y R

5 Los grupos de sustituciones más conservadoras incluyen: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina. También se pueden formular grupos adicionales de aminoácidos utilizando los principios descritos en, por ejemplo, Creighton (1984) *Proteins: Structure and Molecular Properties* (2ª Ed. 1993), W.H. Freeman and Company. En algunos casos, puede ser útil caracterizar mejor las sustituciones basadas en dos o más de dichas características (por ejemplo, la sustitución con un resto "polar pequeño", como un resto Thr, puede representar una sustitución altamente conservadora en un contexto apropiado).

10 Se pueden realizar cambios sustanciales en la función seleccionando las sustituciones que son menos conservadoras que las que se muestran en los grupos definidos, anteriormente. Por ejemplo, se pueden hacer sustituciones no conservadoras que afectan de manera más significativa a la estructura del péptido en el área de la alteración, por ejemplo, la estructura alfa-helicoidal o de hoja beta; a la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana; o al volumen de la cadena lateral. Las sustituciones que generalmente se espera que produzcan los mayores cambios en las propiedades del péptido son aquellas en las que 1) un resto hidrófilo, por ejemplo, serilo o treonilo, se sustituye por (o mediante) un resto hidrófobo, por ejemplo, leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo o alanilo; 15 2) una cisteína o prolina se sustituye por (o mediante) cualquier otro resto; 3) un resto que tiene una cadena lateral electropositiva, por ejemplo, lisilo, arginilo o histidilo, se sustituye por (o mediante) un resto electronegativo, por ejemplo, glutamilo o aspartilo; o 4) un resto que tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo, fenilalanina, se sustituye por (o mediante) un resto que no tiene una cadena lateral, por ejemplo, glicina. En consecuencia, estas y 20 otras sustituciones no conservadoras se pueden introducir en variantes peptídicas donde se desean cambios significativos en la función/estructura y se evitan tales cambios donde se desea la conservación de la estructura/función.

25 Los expertos en la materia conocerán principios adicionales útiles en el diseño y selección de variantes peptídicas. Por ejemplo, los restos en las posiciones superficiales de un péptido normalmente son una fuerte preferencia por los aminoácidos hidrófilos. Las propiedades estéricas de los aminoácidos pueden afectar en gran medida las estructuras locales que una proteína adopta o favorece. La prolina, por ejemplo, exhibe una libertad de torsión reducida que puede llevar a que la conformación de la cadena principal peptídica quede bloqueada en un giro y con la pérdida de enlaces de hidrógeno, lo que a menudo da como resultado que el resto aparezca en un bucle de superficie de una 30 proteína. En contraste con la Pro, la Gly tiene completa libertad de torsión sobre una cadena peptídica principal, de modo que a menudo se asocia con giros cerrados y regiones enterradas en el interior de la proteína (por ejemplo, bolsas hidrófobas). Las características de dichos restos a menudo limitan su participación en estructuras secundarias. Sin embargo, se conocen restos normalmente implicados en la formación de estructuras secundarias. Por ejemplo, los restos tales como Ala, Leu y Glu (aminoácidos sin mucho volumen y/o restos polares) se asocian 35 normalmente con la formación de hélices alfa, mientras que los restos tales como Val, Ile, Ser, Asp y Asn pueden interrumpir la formación de hélices alfa. Los restos con propensión a la formación/inclusión de la estructura de hoja beta incluyen Val e Ile y los restos asociados con las estructuras de giro incluyen Pro, Asp y Gly. El experto en la materia puede considerar estas y otras propiedades de aminoácidos conocidas similares en el diseño y selección de variantes peptídicas adecuadas, de modo que las variantes adecuadas se pueden preparar con solo 40 experimentación de rutina.

45 De manera deseable, la conservación en términos de propiedades hidropáticas/hidrófilas también se conserva sustancialmente en un péptido variante en comparación con un péptido original (por ejemplo, la clase de peso, la puntuación hidropática o ambas de las secuencias son al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o más (por ejemplo, aproximadamente el 65-99 %) retenidas). Los métodos para evaluar la conservación del carácter hidropático de los restos/secuencias son conocidos en la técnica e incorporados en los paquetes de software disponibles, como el programa GREASE disponible a través del Banco de trabajo de biología 50 de SDSC (véase también, por ejemplo, Kyte y Doolittle et al., *J. Mol. Biol.* 157:105-132(1982); Pearson y Lipman, *PNAS* (1988) 85:2444-2448, y Pearson (1990) *Methods in Enzymology* 183:63-98 para una discusión de los principios incorporados en GREASE y programas similares).

55 También es normalmente ventajoso que la estructura del péptido variante sea sustancialmente similar a la estructura del péptido original. Los métodos para evaluar la similitud de los péptidos en términos de sustituciones conservadoras, propiedades hidropáticas, conservación de peso y consideraciones similares se describen en, por ejemplo, las solicitudes de patente internacional WO 03/048185, WO 03/070747 y WO 03/027246. Se pueden hacer comparaciones de estructuras secundarias utilizando el programa EBI SSM (actualmente disponible en <http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/>). Cuando se conocen las coordenadas de la variante, se pueden comparar 60 mediante programas de alineación/comparación tales como la alineación de pares DALI (actualmente disponible en

5 <http://www.ebi.ac.uk/dali/Interactive.html>), TOPSCAN (actualmente disponible en <http://www.bioinf.org.uk/topscan>), COMPARE (actualmente disponible en <http://www.cryst.bioc.cam.ac.uk/COMPARE/>) pares PRIDE (actualmente disponible en <http://hydra.icgeb.trieste.it/pride/pride.php?method=pair>), PINTS (actualmente disponible en <http://www.russell.embl.de/pints/>), SARF2 (actualmente disponible en <http://123d.ncifcrf.gov/run2.html>), el servidor de alineación estructural (actualmente disponible en <http://www.molmovdb.org/align/>) y el servidor de calcular Dos Cadenas CE (actualmente disponible en http://cl.sdsc.edu/ce/ce_align.html). Los métodos de predicción de la estructura de la proteína *ab initio* se pueden aplicar, si es necesario, a la secuencia variante, tal como a través de los programas HMM-ROSETTA o MODELLER, para predecir la estructura para la comparación con la molécula de la secuencia original. Cuando sea apropiado, se pueden utilizar, también o alternativamente, otros métodos de predicción de la estructura, como los métodos de enhebrado, para predecir la estructura de la variante y/o las proteínas de la secuencia original.

15 La retención de restos similares también o alternativamente se puede medir mediante una puntuación de similitud, según lo determinado mediante el uso de un programa BLAST (por ejemplo, BLAST 2.2.8 disponible a través del NCBI). Las variantes adecuadas exhiben normalmente al menos aproximadamente el 45 %, tal como al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o más (por ejemplo, aproximadamente el 70-99 %) de similitud con el péptido original.

20 Como se analiza en otra parte del presente documento, otros puntos de variación/divergencia entre una variante y un original pueden ser aceptables (por ejemplo, inclusión de aminoácidos de origen natural, aminoácidos derivatizados, inserciones, deleciones y extensiones de la secuencia, etc.) siempre que dichos cambios no afecten sustancialmente la capacidad de la variante para unirse al antígeno diana en comparación con el péptido original.

25 La identidad en el contexto de las secuencias de aminoácidos se puede determinar mediante cualquier técnica adecuada, normalmente mediante un análisis de alineación Needleman-Wunsch (véase Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. (1970) 48:443-453), tal como se proporciona a través del análisis con ALIGN 2.0 utilizando la matriz de puntuación BLOSUM50 con una penalización de hueco inicial de -12 y una penalización de extensión de -2 (véase Myers y Miller, CABIOS (1989) 4:11-17 para conocer las técnicas de alineación global incorporadas en el programa ALIGN). Una copia del programa ALIGN 2.0 está disponible, por ejemplo, a través del San Diego Supercomputer (SDSC) Biology Workbench. Debido a que la alineación de Needleman-Wunsch proporciona una medición de identidad total o global entre dos secuencias, debe reconocerse que las secuencias diana que pueden ser porciones o subsecuencias de secuencias peptídicas más grandes se pueden utilizar de manera análoga a las secuencias completas o, como alternativa, se pueden utilizar valores de alineación local para evaluar las relaciones entre las subsecuencias, determinadas por, por ejemplo, una alineación de Smith-Waterman (J. Mol. Biol. (1981) 147:195-197), que se puede obtener a través de los programas disponibles (otros métodos de alineación locales que pueden ser adecuados para analizar la identidad incluyen programas que aplican algoritmos de alineación local heurísticos tales como los programas FastA y BLAST). Otros métodos relacionados para evaluar la identidad se describen en, por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 03/048185. El algoritmo de Gotoh, que busca mejorar el algoritmo de Needleman-Wunsch, se puede utilizar alternativamente para alineamientos de secuencias globales. Véase, por ejemplo, Gotoh, J. Mol. Biol. 162:705-708 (1982).

45 Normalmente, los cambios de secuencia ventajosos son aquellos que (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión de la secuencia variante (normalmente incrementando de forma deseable la afinidad) y/o (4) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales en la variante asociada/péptido análogo. En el contexto de las variantes de región CDR y FR, normalmente se desea que los restos requeridos para soportar y/u orientar la(s) estructura(s) de bucle estructural de CDR sean retenidos; los restos que caen dentro de aproximadamente 10 angstroms de un bucle estructural de CDR (pero opcionalmente solo los restos en esta área que también poseen una superficie accesible de solvente acuoso de aproximadamente 5 angstroms² o mayor) no están modificados o están modificados solo por sustituciones conservadoras de restos de aminoácidos; y/o que la secuencia está sujeta solo a un número limitado de inserciones y/o eliminaciones (si las hubiera), de modo que las estructuras de tipo bucle estructural de la CDR se conserven en la variante (se proporciona una descripción de las técnicas relacionadas y los principios relevantes en, por ejemplo, Schiweck et al., J Mol Biol. 23 de mayo de 1997;268(5):934-51; Morea, Biophys Chem. Octubre de 1997;68(1-3):9-16; Shirai et al., FEBS Lett. 9 de diciembre de 1996;399(1-2):1-8; Shirai et al., FEBS Lett. 16 de julio de 1999;455(1-2):188-97; Reckzo et al., Protein Eng. Abril de 1995;8(4):389-95; y Eigenbrot et al., J Mol Biol. 20 de Febrero de 1993;229(4):969-95).

60 Como ya se ha mencionado, las variaciones en la secuencia de aminoácidos pueden dar como resultado un patrón de glucosilación alterado en la secuencia de anticuerpo variante con respecto a una secuencia de anticuerpo original. "Alterar" en este contexto significa la eliminación de uno o más sitios de glucosilación encontrados en el anticuerpo original y/o agregar uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo original. La glucosilación de anticuerpos normalmente está ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión de la fracción de hidrato de carbono con la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son secuencias de reconocimiento habituales para la unión enzimática de la fracción de hidrato de carbono con la cadena lateral de

asparagina. Por consiguiente, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido puede crear un posible sitio de glucosilación. Ligada a O se refiere a la unión de azúcares tales como N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un ácido hidroxiamino, más habitualmente serina o treonina, aunque también pueden utilizarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se puede lograr convenientemente mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos de la variante con respecto a la secuencia original, de manera que se provoca que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para los sitios de glicosilación ligados a N) u otro sitio de glucosilación adecuado. La alteración también puede realizarse mediante, por ejemplo, la adición de, o la sustitución mediante, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación ligados a O).

Utilizando las técnicas descritas anteriormente y otras técnicas descritas en el presente documento, la invención proporciona varios métodos para generar variantes útiles de anticuerpos y péptidos similares a anticuerpos que son similares a uno o más anticuerpos anti-KIR "originales" producidos por mamíferos u otros cordados (o células obtenidas o que proceden de cualquiera de ellas, tal como un hibridoma que procede de células de mamífero) en respuesta a la inmunización con un NKCAMR, porción de NKCAMR o proteína que comprende secuencias de NKCAMR (por ejemplo, un KIR, una porción de KIR o proteína que comprende secuencias KIR).

Las variantes de la secuencia de aminoácidos generalmente se pueden obtener, por ejemplo, introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en un ácido nucleico que codifica un anticuerpo (por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio), mediante síntesis química de péptidos o cualquier otra técnica adecuada. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, variantes que se diferencian por supresiones de, inserciones en, adiciones a (en cualquiera de los extremos de la secuencia original) y/o sustituciones de, restos dentro de las secuencias de aminoácidos originales de los anticuerpos anti-KIR conocidos, y dentro de las secuencias de anticuerpos anti-KIR proporcionadas en el presente documento. Se puede hacer cualquier combinación de deleciones, inserciones, adiciones y sustituciones para llegar a una variante deseada, siempre que la variante posea características adecuadas para la práctica en los métodos de la invención (por ejemplo, retención de al menos una parte sustancial de la afinidad, especificidad y/o selectividad los anticuerpos originales con respecto a uno o más epítomos KIR). Los cambios en la secuencia de aminoácidos, con respecto a un anticuerpo original, también pueden alterar los procesos posteriores a la traducción del anticuerpo variante con respecto a un anticuerpo original, tal como mediante el cambio del número o la posición de los sitios de glucosilación.

Otras técnicas potencialmente adecuadas para preparar variantes de secuencias de anticuerpos incluyen la mutagénesis ambulante de CDR, la combinación de cadenas de anticuerpos, la "mutagénesis parsimoniosa" (Balint y Larrick Gene 137:109-118 (1993)) y otras técnicas de maduración de afinidad (véase, por ejemplo, Wu et al. PNAS (USA) 95: 6037-6-42 (1998)). Los procedimientos de clonación de repertorio también pueden ser útiles en la producción de anticuerpos variantes (véase, por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 96/33279).

Cuando se realizan inserciones en la región hipervariable para generar una anticuerpo variante, se toma en cuenta regularmente el intervalo típico de longitudes de la región hipervariable en cuestión en anticuerpos similares conocidos. Por ejemplo, para la primera región hipervariable de un dominio variable de cadena ligera, se pueden introducir inserciones en la secuencia CDR L1 de un anticuerpo original mientras se retiene un tamaño apropiado sustancialmente similar y, por lo tanto, esperado, que de acuerdo con Kabat et al., citado anteriormente, por ejemplo, normalmente tiene un total de aproximadamente 9-20 (por ejemplo, aproximadamente 10-17) restos. De forma similar, la CDR L2 tiene normalmente una longitud total de aproximadamente 5-10 restos; la CDR L3 tiene normalmente una longitud de aproximadamente 7-20 restos; la CDR H1 tiene normalmente una longitud de aproximadamente 10-15 restos; la CDR H2 tiene normalmente una longitud de aproximadamente 15-20 restos; y la CDR H3 tiene normalmente una longitud de aproximadamente 6-30 restos (por ejemplo, 3-25 restos). Las inserciones en la región VH se hacen normalmente en CDR H3 y normalmente cerca del extremo C del dominio, tal como aproximadamente 97-102 restos de la CDR H3 original (por ejemplo, adyacente a y, preferentemente, C-terminal en secuencia al, resto número 100 de la secuencia de CDR H3 original) utilizando la alineación y numeración como se describe en Kabat. Las variantes de anticuerpo con uno o más restos de aminoácido insertado en una región hipervariable del mismo pueden prepararse aleatoriamente, especialmente cuando la afinidad de unión inicial del anticuerpo original para el antígeno diana es tal que las variantes de anticuerpo producidas aleatoriamente se pueden seleccionar fácilmente. Por ejemplo, la visualización de fagos proporciona un método conveniente para detectar dichas variantes aleatorias.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminales que varían en longitud desde un resto hasta polipéptidos que contienen cien o más restos (a veces referidos por separado como "adiciones"), así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto metionilo N terminal o el anticuerpo fusionado a un marcador de epítomo. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo a una enzima o un polipéptido o PEG que aumenta la semivida en suero del anticuerpo. Dichas proteínas de fusión de anticuerpos se describen por separado en otra parte en el presente documento.

Para los anticuerpos, los sitios de mayor interés para las variaciones de sustitución son las regiones hipervariables (o CDR particulares), pero las alteraciones del marco (FR) también están dentro del alcance de las variantes de

anticuerpos y pueden estar asociadas con propiedades ventajosas e inserciones y deleciones en las regiones FR se puede requerir para obtener una alineación adecuada u óptima de las secuencias CDR, por ejemplo, cuando se utilizan secuencias de anticuerpos híbridos. Una sustitución u otra modificación (inserción, eliminación o combinación de cualquiera de ellas) en una región marco o dominio constante también se puede asociar con un aumento en la semivida del anticuerpo variante con respecto al anticuerpo original. También se puede hacer una variación en una región marco o dominio constante para alterar la inmunogenicidad del anticuerpo variante con respecto al anticuerpo parental, para proporcionar un sitio para la unión covalente o no covalente a otra molécula, o para alterar dichas propiedades como fijación del complemento. Se pueden realizar variaciones en una variante de anticuerpo en cada una de las regiones marco, el dominio constante y/o las regiones variables (o una cualquiera o más de sus CDR) en una única variante de anticuerpo. Como alternativa, se pueden hacer variaciones en solo una de las regiones marco, las regiones variables (o una única CDR de las mismas) o el dominio constante en un anticuerpo. Las técnicas de mutagénesis de escaneo mediante alanina, como las descritas por Cunningham y Wells (1989), Science 244:1081-1085, se pueden utilizar para identificar restos adecuados para la sustitución o la eliminación en la generación de anticuerpos que comprenden variantes de VL, VH o secuencias CDR particulares, aunque también se pueden aplicar otras técnicas de mutagénesis adecuadas. Por ejemplo, también se pueden hacer y probar múltiples sustituciones de aminoácidos utilizando métodos conocidos de mutagénesis y detección, como los desvelados por Reidhaar-Olson y Sauer, Science 241:53-57 (1988) o Bowie y Sauer Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2152-2156 (1989). Las técnicas adicionales que se pueden utilizar para generar anticuerpos variantes incluyen la evolución dirigida y otras técnicas de generación de variantes descritas en, por ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. 20040009498; Marks et al., Methods Mol Biol. 2004;248:327-43 (2004); Azriel-Rosenfeld et al., J Mol Biol. 2 de enero de 2004;335 (1):177-92; Park et al., Biochem Biophys Res Commun. 28 de agosto de 2000;275(2):553-7; Kang et al., Proc Natl Acad Sci USA. 15 de diciembre de 1991;88(24):11120-3; Zahnd et al., J Biol Chem. 30 de abril de 2004;279(18):18870-7; Xu et al., Chem Biol. Agosto de 2002;9(8):933-42; Border et al., Proc Natl Acad Sci USA. 26 de septiembre de 2000;97(20):10701-5; Cramer et al., Nat Med. Enero de 1996;2(1):100-2; y como se describe más generalmente en, por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 03/048185.

Para mejorar aún más la calidad y/o la diversidad de las secuencias de anticuerpos, los segmentos VL y VH de los pares VL/VH se pueden mutar aleatoriamente, normalmente al menos dentro de la región CDR3 de VH y/o VL, en un proceso análogo al proceso de mutación somática *in vivo* responsable de la maduración de la afinidad de los anticuerpos durante una respuesta inmunitaria natural. Dicha maduración de afinidad *in vitro* se puede lograr, por ejemplo, mediante la amplificación de las regiones VH y VL utilizando cebadores de PCR complementarios a las secuencias codificantes VH CDR3 o VL CDR3, respectivamente, cuyos cebadores normalmente están "enriquecidos" con una mezcla aleatoria de las cuatro bases de nucleótidos en ciertas posiciones, de manera que los productos de la PCR resultantes codifican segmentos VH y VL en los que se han introducido mutaciones aleatorias, lo que da como resultado (al menos en algunos casos) la introducción de variaciones de secuencia en las regiones VH y/o VL CDR3. Dichos segmentos VH y VL mutados aleatoriamente se pueden volver a seleccionar mediante la presentación de fagos u otra técnica adecuada para unirse a dianas (como uno o más KIR) y se pueden analizar y utilizar variantes ventajosas para preparar nuevos anticuerpos anti-KIR.

En el diseño, construcción y/o evaluación de variantes de CDR, se puede prestar atención al hecho de que las regiones CDR se pueden modificar para permitir una mejor unión del epítipo. Las CDR de anticuerpos normalmente funcionan mediante la construcción de un "bolsillo", u otra estructura paratópica, dentro de la cual encaja el epítipo. Si el epítipo no se ajusta bien, es posible que el anticuerpo no ofrezca la mejor afinidad. Sin embargo, al igual que con los epítopos, a menudo hay algunos restos clave en una estructura paratópica que representan la mayor parte de esta unión. Por consiguiente, las secuencias CDR pueden variar significativamente en longitud y composición entre anticuerpos específicos para la misma proteína diana. El experto en la materia reconocerá que ciertos restos, tales como restos de tirosina (por ejemplo, en el contexto de las secuencias CDR-H3), que a menudo son contribuyentes significativos a dicha unión del epítipo, normalmente se retienen de manera deseable en una variante de CDR.

Como ya se ha mencionado, una forma conveniente para generar variantes de sustitución es la maduración de afinidad utilizando métodos que utilizan fagos conocidos en la técnica. Con el fin de identificar los sitios de la región hipervariable candidatos para la modificación, también se puede realizar una mutagénesis de escaneo mediante alanina para identificar restos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión al antígeno. Como alternativa o de modo adicional, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y restos vecinos son probablemente candidatos adecuados para la sustitución.

Los métodos útiles para el diseño racional de las variantes de secuencias CDR se describen en, por ejemplo, las solicitudes de patente internacional WO 91/09967 y WO 93/16184. Consideraciones adicionales en la producción/selección de variantes peptídicas (por ejemplo, la conservación de las características funcionales de los restos de aminoácidos, la conservación de los restos de aminoácidos basándose en las características hidropáticas y/o la conservación de los restos de aminoácidos basándose en el peso/tamaño, se describen en otra parte en el presente documento. Normalmente, las variaciones de la secuencia de aminoácidos, tales como variaciones de sustitución conservadoras, deseablemente no cambian de manera sustancial las características estructurales de la

secuencia original (por ejemplo, un aminoácido de reemplazo no debería tender a alterar la estructura secundaria que caracteriza la función de la secuencia original). Ejemplos de estructuras secundarias y terciarias polipeptídicas reconocidas en la técnica se describen en, por ejemplo, *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden y J. Tooze, eds., Garland Publishing, Nueva York, N. Y. (1991)); y Thornton et al. *Nature* 354:105 (1991). Principios adicionales relevantes para el diseño y la construcción de variantes de péptidos se analizan en, por ejemplo, Collinet et al., *J Biol Chem* 9 de junio de 2000;275(23):17428-33.

La frase "posibles interacciones de aminoácidos" se puede utilizar para referirse a contactos o interacciones energéticamente favorables entre uno o más restos de aminoácidos presentes en un antígeno y uno o más restos de aminoácidos que no existen en una secuencia de anticuerpo original, pero se pueden introducir en una secuencia variante para aumentar los contactos de aminoácidos entre el antígeno y una variante de secuencia de anticuerpo que comprende dichos restos introducidos. Preferentemente, las interacciones de aminoácidos de interés se seleccionan entre interacciones de enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals y/o interacciones iónicas.

En un aspecto a modo de ejemplo particular, el anticuerpo anti-KIR se caracteriza porque hay menos de aproximadamente 10, tal como inferior a aproximadamente 5, tal como 3 o menos variaciones de aminoácidos presentes en las regiones VH o VL de la secuencia del anticuerpo variante con respecto a la secuencia de anticuerpo anti-KIR de tipo silvestre relacionada más cercana en el contexto de un anticuerpo anti-KIR (por ejemplo, una secuencia del anticuerpo DF200). En otro aspecto ejemplar, el anticuerpo anti-KIR comprende una variante de secuencia en la que menos de aproximadamente 15, tal como inferior a aproximadamente 10, tal como inferior a aproximadamente 5 variaciones de aminoácidos existen en los dominios constantes del anticuerpo variante con respecto a la secuencia mayormente relacionada en un anti-KIR de tipo silvestre relacionado, por ejemplo, anticuerpo DF200.

Tal como se describe en otra parte en el presente documento, los anticuerpos anti-KIR se pueden presentar como proteínas de cadena única o como multímeros (por ejemplo, dímeros, trímeros, tetrámeros (como en el caso de los anticuerpos de tipo silvestre) o multímeros de orden superior). Los anticuerpos anti-KIR y fragmentos de anticuerpos estarán normalmente al menos en forma heterotrimérica si no en formas multiméricas superiores, como las asociadas con los anticuerpos IgM. Los anticuerpos anti-KIR procedentes de proteínas monoméricas se pueden modificar mediante la inclusión de secuencias promotoras de la multimerización conocidas en la técnica (ejemplos de los cuales se describen en otra parte en el presente documento).

Normalmente, las secuencias variantes conservan deseablemente una estructura similar a las secuencias originales similares. La estructura de la proteína se puede evaluar mediante cualquier número de técnicas adecuadas, como las técnicas de determinación de la estructura espectroscópica por resonancia magnética nuclear (RMN), que son bien conocidos en la técnica (Véase, por ejemplo, Wuthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, Nueva York, 1986; Wuthrich, K. *Science* 243:45-50 (1989); Clore et al., *Crit. Rev. Bioch. Molec. Biol.* 24:479-564 (1989); Cooke et al. *Bioassays* 8:52-56 (1988)), generalmente en combinación con métodos de modelado por ordenador (por ejemplo, mediante el uso de programas como MACROMODEL™, INSIGHT™ y DISCOVER™), para obtener requisitos espaciales y de orientación para los análogos estructurales. Mediante la utilización de la información obtenida por estas y otras técnicas conocidas adecuadas, los análogos estructurales se pueden diseñar y producir mediante sustituciones, inserciones y/o eliminaciones de aminoácidos basadas racionalmente. Los métodos de modelado de estructura de proteínas basados en ordenador, que también pueden ser útiles a este respecto, se describen en otra parte en el presente documento.

Como ya se indicó, normalmente es deseable que las secuencias variantes retengan al menos una proporción sustancial de la funcionalidad de las secuencias originales de las que proceden, tales como con respecto a la afinidad y/o especificidad del antígeno (pueden ocurrir excepciones donde, por ejemplo, la función particular, tal como las funciones mediadas por el dominio constante, se busca reducir o eliminar). Las regiones funcionales o activas del anticuerpo pueden identificarse mediante mutagénesis de una región específica de la proteína, seguida de la expresión y prueba del polipéptido expresado. Dichos métodos son fácilmente evidentes para un experto en la técnica y pueden incluir mutagénesis específica del sitio del ácido nucleico que codifica el anticuerpo u otra proteína de unión a NKCAMR. Véase, por ejemplo, Zoller M J et al. *Nucl. Acids Res.* 10:6487-500 (1982) para la discusión de principios relacionados.

2. Variantes de las secuencias de anticuerpos anti-KIR

Con el fin de ilustrar mejor el uso de variantes de secuencias en los anticuerpos anti-KIR, en el presente documento, se proporcionan varias estrategias y fórmulas específicas para generar variantes de secuencias de anticuerpos para incorporarlas en los anticuerpos anti-KIR y utilizarlas en la producción de los mismos.

En un aspecto, el anticuerpo anti-KIR comprende una variante de secuencia CDR L1 que consiste esencialmente en una secuencia de acuerdo con la fórmula Xaa₁ Ala Ser Xaa₄ Xaa₅ Val Xaa₇ Ser Xaa₉ Tyr Leu Xaa₁₂ (SEQ ID NO:16), en donde cada "Xaa" representa cualquier resto de aminoácido adecuado (Fórmula I). En un aspecto, el anticuerpo anti-KIR comprende una secuencia variante de CDR L1 de acuerdo con la Fórmula I en la que la secuencia se

caracteriza adicionalmente por uno o más de los siguientes: Xaa₁ es Lys o Thr; Xaa₄ es Glu o Ser; Xaa₅ es Asn o Ser; Xaa₇ es Val o Ser; Xaa₉ es Ser o está ausente; y Xaa₁₂ es Ser o Tyr (Fórmula Ia).

5 En otro aspecto, el anticuerpo anti-KIR comprende una variante de secuencia CDR L1 que consiste esencialmente en una secuencia de acuerdo con la fórmula Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Xaa₈ Xaa₉ Xaa₁₀ Xaa₁₁ Xaa₁₂, en la que (a) Xaa₁ es Lys o Thr; Xaa₄ es Glu o Ser; Xaa₅ es Asn o Ser; Xaa₇ es Val o Ser; y Xaa₁₂ es Ser o Tyr; (b) Xaa₈ y Xaa₁₁ son cualquier restos de aminoácido adecuado, Xaa₈ es Thr o Ser, Xaa₁₁ es Val o Leu, o Xaa₈ es Thr o Ser y Xaa₁₁ es Val o Leu; (c) Xaa₉ es Ser, está ausente o es cualquier resto de aminoácido adecuado distinto de Ser (por ejemplo, Gly); y (d) Xaa₂Xaa₃ Xaa₆Xaa₁₀ y Xaa₁₁ están definidas cada una por las posiciones correspondientes en la
10 Fórmula I (por ejemplo, Xaa₂ es Ala), opcionalmente, excepto uno o más de los siguientes: Xaa₂ es cualquier resto adecuado distinto de Ala; Xaa₃ es cualquier resto adecuado distinto de Ser; Xaa₆ es cualquier resto adecuado distinto de Val; Xaa₁₀ es cualquier resto adecuado distinto de Tyr; y Xaa₁₁ es cualquier resto adecuado distinto de Leu (Fórmula II). En otro aspecto, una variante similar de CDR L1 difiere de la SEQ ID NO: 1 y/o la SEQ ID NO: 2 solo en una o más variaciones de secuencia definidas por la parte (a) o la parte (b) de la Fórmula (IIa).

15 En otro aspecto, el anticuerpo anti-KIR comprende una variante de CDR L2 que consiste esencialmente en una secuencia de acuerdo con la fórmula Xaa₁ Xaa₂ Ser Asn Xaa₅ Xaa₆ Ser, en donde Xaa es cualquier resto de aminoácido adecuado (Fórmula III). En un aspecto más particular, el anticuerpo anti-KIR comprende una variante de CDR L2 que consiste esencialmente en una secuencia de Fórmula III en la que la secuencia se caracteriza por uno o
20 más de los siguientes: Xaa₁ es Gly o Ser; Xaa₂ es Ala o Thr; Xaa₅ es Arg o Leu; y Xaa₆ es Tyr o Ala (Fórmula IIIa).

En una faceta adicional, el anticuerpo anti-KIR comprende una variante de CDR L2 que consiste esencialmente en una secuencia de acuerdo con la fórmula Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇, en donde (a) Xaa₁ es Gly o Ser, Xaa₂ es Ala o Thr, Xaa₅ es Arg o Leu y Xaa₆ es Tyr o Ala; (b) Xaa₇ es cualquier resto adecuado (como un resto de Ala u otro resto flexible), Thr o Ser; y (c) Xaa₃ es una Ser y Xaa₄ es cualquier resto adecuado distinto de Asn, Xaa₃ es cualquier resto adecuado distinto de Ser y Xaa₄ es Asn, o Xaa₃ es cualquier resto adecuado distinto de Ser y Xaa₄ es cualquier resto adecuado distinto de Asn (Fórmula IV). En otro aspecto, una secuencia variante de CDR L2 similar difiere de la SEQ ID NO: 3 y/o la SEQ ID NO: 4 solo por (i) uno o más cambios definidos por la parte (a) o (ii) uno o ambos cambios en la parte (c) de la fórmula IV.
25
30

En otro aspecto más, el anticuerpo anti-KIR comprende una secuencia variante de CDR L3 que consiste esencialmente en una secuencia de acuerdo con la fórmula Xaa₁ Gln Xaa₃ His Xaa₅ Xaa₆ Pro Xaa₈ Thr (SEQ ID NO: 17), donde Xaa es cualquier resto de aminoácido adecuado (Fórmula V). En un aspecto más particular, el anticuerpo anti-KIR comprende una variante de CDR L3 que consiste esencialmente en una secuencia de acuerdo con la
35 Fórmula V en donde la secuencia se caracteriza adicionalmente por que uno o más de los siguientes Xaa₁ es Gly o His, Xaa₃ es Gly o Tyr, Xaa₅ es Ser o Arg, Xaa₆ es Tyr o Ser y Xaa₈ es Tyr o Pro (Fórmula Va).

En una faceta adicional, el anticuerpo anti-KIR comprende una secuencia variante de CDR L3 que consiste esencialmente en una secuencia de acuerdo con la fórmula Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Xaa₈ Xaa₉, en donde (a) Xaa₁ es Gly o His, Xaa₃ es Gly o Tyr, Xaa₅ es Ser o Arg, Xaa₆ es Tyr o Ser y Xaa₈ es Tyr o Pro; (b) Xaa₄ es Tyr, His u otro resto adecuado (por ejemplo, otro resto asociado a cicloalqueno); y (c) Xaa₂, Xaa₇ y Xaa₉ se definen de acuerdo con las posiciones correspondientes en la Fórmula V, excepto en uno o más de los siguientes: Xaa₂ es cualquier resto adecuado distinto de Gin, Xaa₇ es cualquier resto adecuado distinto de Pro y Xaa₉ es cualquier resto adecuado distinto de Thr (Fórmula VI). En otro aspecto, el anticuerpo anti-KIR comprende una
45 variante de CDR L3 que consiste esencialmente en una secuencia de Fórmula V pero en la que todos de Xaa₁, Xaa₃, Xaa₆ y Xaa₈ corresponden a las posiciones idénticas en la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6 o Xaa₂, Xaa₇ y Xaa₉ corresponden a las posiciones idénticas en la Fórmula V.

En otra faceta, el anticuerpo anti-KIR comprende una variante de CDR H1 que consiste esencialmente en una
50 secuencia de acuerdo con la fórmula Gly Phe Ser Xaa₄ Thr Xaa₆ Tyr Gly Val His (SEQ ID NO: 18), en donde Xaa₄ es cualquier resto adecuado distinto de Glu (por ejemplo, Leu), Xaa₆ es cualquier resto adecuado distinto de Phe (por ejemplo, Ser), o Xaa₄ y Xaa₆ representan cualquier resto adecuado distinto de Glu y Phe, respectivamente (Fórmula VII).

55 En otro aspecto más, el anticuerpo anti-KIR comprende una variante de CDR H1 que consiste esencialmente en una secuencia de acuerdo con la fórmula Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Glu Xaa₅ Phe Xaa₇ Xaa₈ Xaa₉ Xaa₁₀, en donde uno o más de Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃, Xaa₅, Xaa₇, Xaa₈, Xaa₉ y Xaa₁₀ difieren de la posición correspondiente en la SEQ ID NO: 7 (Fórmula VIII). En un aspecto, el anticuerpo anti-KIR comprende una variante de CDR H1 que consiste esencialmente en una secuencia de Fórmula VIII en la que la secuencia de Fórmula VIII muestra al menos el 70 % (tal como al menos el 80 % o al menos el 90 %) de identidad con la SEQ ID NO: 7.
60

En una faceta adicional, el anticuerpo anti-KIR comprende una variante de CDR H2 que consiste esencialmente en una secuencia de acuerdo con la fórmula Val Ile Trp Ser Gly Gly Xaa₇ Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser (SEQ ID NO:19), en donde Xaa₇ es cualquier resto adecuado distinto de Asn (Fórmula IX).
65

En un aspecto adicional, el anticuerpo anti-KIR comprende una variante de secuencia CDR H2 que consiste

esencialmente en una secuencia de acuerdo con la fórmula Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Asn Xaa₈ Xaa₉ Xaa₁₀ Xaa₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Xaa₁₄ Xaa₁₅ Xaa₁₆, en donde la secuencia muestra al menos aproximadamente el 60 %, normalmente al menos aproximadamente el 70 %, tal como aproximadamente el 80 % o más (por ejemplo, aproximadamente el 90 % o más) de identidad con la SEQ ID NO: 8, pero difiere en una o más sustituciones en una cualquiera de las posiciones Xaa₁-Xaa₆ y Xaa₈-Xaa₁₆ (Fórmula X).

Otro anticuerpo anti-KIR comprende una variante de CDR H3 que consiste esencialmente en una secuencia de acuerdo con la fórmula Asn Pro Arg Pro Gly Asn Tyr Arg Tyr Gly Xaa₁₁ Xaa₁₂ Tyr (SEQ ID NO:20), en donde Xaa₁₁ es cualquier resto adecuado distinto de Met y Xaa₁₂ es Asp, Xaa₁₁ es Met y Xaa₁₂ es cualquier resto adecuado distinto de Asp, o Xaa₁₁ y Xaa₁₂ representan cualquier resto adecuado distinto de Met y Asp, respectivamente (Fórmula XI).

Otro anticuerpo anti-KIR comprende una variante de CDR H3 que consiste esencialmente en una secuencia de acuerdo con la fórmula Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Xaa₈ Xaa₉ Xaa₁₀ Xaa₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃, en donde la secuencia muestra al menos aproximadamente el 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 9 (Fórmula XII), normalmente mediante 1-4 sustituciones en Xaa₁-Xaa₁₃. En un aspecto, la Xaa₁₁ es Met y/o Xaa₁₂ es Asp.

El anticuerpo anti-KIR puede comprender una variante de CDR-H1 que consiste esencialmente en una secuencia de acuerdo con la fórmula Gly Xaa₂ Xaa₃ Phe Thr Xaa₆ Tyr Xaa₈ Xaa₉ His (SEQ ID NO: 21), en donde Xaa₂ es un resto cicloalquenoilo, normalmente un resto aromático y más normalmente Phe o Tyr; Xaa₃ se selecciona de Ser, Thr, Ala, Asn y Gln y más normalmente de Ser, Thr y Ala o incluso más normalmente de Ser o Thr; Xaa₆ es Pro o Ser; Xaa₈ es Gly o Trp; y Xaa₉ se selecciona de Met, Ile, Leu, Val y Phe o más normalmente de Met, Ile, Leu y Val (Fórmula XIII).

En un aspecto adicional, el anticuerpo anti-KIR comprende una variante de CDR-H1 que consiste esencialmente en una secuencia de acuerdo con la fórmula Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Xaa₈ Xaa₉ Xaa₁₀, en donde Xaa₂, Xaa₃, Xaa₆, Xaa₈ y Xaa₉ son como se definieron en la Fórmula XIII y Xaa₁, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₇ y Xaa₁₀ representan los mismos restos que se encuentran en las posiciones correspondientes en la Fórmula XIII, excepto por uno o más de los siguientes: Xaa₁ es cualquier resto adecuado distinto de Gly; Xaa₄ es cualquier resto adecuado distinto de Phe; Xaa₅ es cualquier resto adecuado distinto de Thr; Xaa₇ es cualquier resto adecuado distinto de Tyr; y Xaa₁₀ es cualquier resto adecuado distinto de His (Fórmula XIV).

En un sentido más general, los anticuerpos anti-KIR comprenden una o más variantes de CDR que son altamente similares a las SEQ ID NOS: 1-9 (por ejemplo, los anticuerpos anti-KIR comprenden al menos una variante de CDR que exhibe al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o más de identidad con al menos una de las SEQ ID NO: 1-9).

En un aspecto adicional, los anticuerpos anti-KIR comprenden una combinación de dichas variantes de CDR (por ejemplo, un anticuerpo anti-KIR que comprende una variante de CDR L1 de acuerdo con las Fórmulas I-II, una variante de CDR L2 de acuerdo con las Fórmulas III-IV, una variante de CDR L3 de acuerdo con las Fórmulas V-VI, una variante de CDR H1 de acuerdo con las Fórmulas VII-VIII, una variante de CDR H2 de acuerdo con las Fórmulas IX-X y/o una variante de CDR H3 de acuerdo con las Fórmulas XI-XII). En una faceta adicional, el anticuerpo anti-KIR comprende una combinación de dichas variantes de CDR y una o más secuencias CDR seleccionadas de las SEQ ID NOS: 1-9.

Se describe un método para preparar secuencias de anticuerpos variantes de unión a KIR (para su incorporación en un anticuerpo anti-KIR artificial) que comprende la preparación de un anticuerpo o proteína que comprende una secuencia de anticuerpos que comprende una combinación de CDR variantes como se define en las fórmulas anteriores (por ejemplo, Fórmulas i-XII), que evalúa la afinidad de la secuencia del anticuerpo variante para al menos un KIR y selecciona una secuencia que se une a al menos un KIR con un nivel de afinidad al menos predeterminado (un nivel que es normalmente comparable con los descritos en otra parte en el presente documento).

Los anticuerpos monoclonales en particular se pueden hacer utilizando el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., Nature, 256:495 (1975) o por otros métodos bien conocidos, desarrollados posteriormente (véase, por ejemplo, Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pág.59-103 (Academic Press, 1986)). Los hibridomas y otras células de fusión pueden formarse mediante fusión química, fusión eléctrica o cualquier otra técnica adecuada, con cualquier tipo adecuado de mielomas, heteromiomas, células foblastoides, plasmocitomas o células inmortalizadas similares y cualquier tipo adecuado de célula(s) que expresan anticuerpos.

Los linfocitos B inmortalizados transformados también pueden utilizarse para producir anticuerpos de manera eficaz. Los linfocitos B transformados se pueden producir mediante técnicas estándar, como la transformación con un virus de Epstein Barr o un gen transformador. (Véase, por ejemplo, "Continuously Proliferating Human Cell Lines Synthesizing Antibody of Predetermined Specificity", Zurawaki, V. R. et al, en Monoclonal Antibodies, ed. por Kennett R. H. et al, Plenum Press, N. Y. 1980, pág. 19-33.). Por consiguiente, se describen células y líneas celulares que expresan anticuerpos anti-KIR estables y continuas y/o inmortalizadas. Una etapa de un método para producir

anticuerpos anti-KIR puede incluir, por ejemplo, una etapa de producción de linfocitos B inmortalizados que producen un anticuerpo anti-AMR y/o un anticuerpo anti-STM que se fusionan con socios apropiados para producir un anticuerpo anti-KIR o que se secuencian y dichas secuencias se utilizan para producir un anticuerpo anti-KIR recombinante.

5 Las líneas celulares disponibles como hospedadores para la expresión de proteínas recombinantes son bien conocidas en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Estas incluyen, entre otras, células de ovario de hámster chino (CHO), NSO, células SP2, células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células A549 y varias otras líneas celulares. Otras líneas celulares que pueden utilizarse son líneas celulares de insectos, tales como las células Sf9. Cuando los ácidos nucleicos (o vectores que contienen ácidos nucleicos) que codifican genes de anticuerpos se introducen en células hospedadoras de mamíferos, los anticuerpos se pueden producir mediante el cultivo de las células hospedadoras durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras o, más preferentemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se hacen crecer las células hospedadoras. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo utilizando métodos de purificación de proteínas convencionales. Los anticuerpos también pueden recuperarse de los lisados de las células hospedadoras cuando se expresan directamente sin una señal secretora.

20 La purificación de anticuerpos de cultivos celulares, lisados celulares y animales transgénicos o materiales biológicos obtenidos a partir de ellos (por ejemplo, del fluido ascítico de un animal transgénico productor de anticuerpos) se puede lograr mediante la aplicación de cualquier número de técnicas adecuadas conocidas en la técnica, incluyendo, por ejemplo, purificación en columna de inmunoafinidad; precipitación con sulfato; cromatografía; SDS-PAGE preparatoria y similares.

25 Los anticuerpos anti-KIR también se pueden producir en células bacterianas y en microorganismos unicelulares eucariotas, tales como levadura. Los anticuerpos producidos por células bacterianas carecen de glucosilación normal y, por consiguiente, pueden ser deficientes en términos de funciones de ADCC y otros aspectos de la respuesta inmunitaria que, de lo contrario, pueden asociarse con anticuerpos esencialmente idénticos producidos en células y/o animales mamíferos. Los anticuerpos producidos por células de levadura, por ejemplo, normalmente exhiben diferentes tipos de patrones de glucosilación que los anticuerpos producidos en células de mamíferos. Sin embargo, los métodos para producir anticuerpos con glucosilación eficaz en levaduras se han desarrollado recientemente y se han comercializado por compañías tales como Glycofi, Inc. (Lebanon, NH, USA) (véase, por ejemplo, Hamilton et al., Science. 29 de agosto de 2003;301(5637): 1244-6; Choi et al., Proc Natl Acad Sci USA. 29 de abril de 2003;100(9):5022-7; y Gerngross et al., "Production of Complex Human Glycoproteins in Yeast" presentado en "Antibody Engineering and Optimization", disponible a través de los Procedimientos del Instituto de Salud de Cambridge (presentado el 28 de abril de 2004). La glucosilación de proteínas también se puede modificar utilizando técnicas como las que se describen en las solicitudes de patente de EE.UU. 20030124645, 20030180835, 20040063911 y la patente de EE.UU. 6.379.933. Los anticuerpos anti-KIR se pueden producir en levaduras y células similares. Por ejemplo, un método de producción de anticuerpos anti-KIR puede incluir la etapa de producir un anticuerpo anti-KIR en una célula de levadura de acuerdo con dichos métodos, por ejemplo, utilizando ácidos nucleicos que codifican partes de anticuerpos anti-KIR descritos en el presente documento, para producir un anticuerpo anti-KIR que presenta patrones de glucosilación humana en secuencias de anticuerpo anti-AMR humano y/o anticuerpo anti-STM producidas en el mismo.

45 Los anticuerpos anti-KIR se pueden purificar utilizando una cualquiera o una combinación de técnicas bioquímicas conocidas.

50 Por ejemplo, el caldo de cultivo celular de polidoma que expresa anticuerpos anti-KIR se puede centrifugar; el sobrenadante resultante recoger; y el sobrenadante someter a salazón (normalmente utilizando sulfato de amonio o sulfato de sodio). El precipitado de proteínas obtenido se puede disolver en una solución apropiada y dializar, y someter a cromatografía en columna (utilizando, por ejemplo, una columna de intercambio iónico, una columna de filtración en gel, una columna de proteína A o una columna de hidroxapatita) para separar y purificar el anticuerpo anti-KIR deseado. La separación y purificación en un solo paso también se puede llevar a cabo mediante el proceso que utiliza una columna en la que se han inmovilizado un NKCAMR diana y un STM diana (o moléculas relacionadas).

60 Otros métodos adecuados para purificar los anticuerpos anti-KIR incluyen enfoque isoeléctrico, cromatografía de afinidad, que incluye cromatografía de doble afinidad (por ejemplo, el uso de anticuerpos monoclonales antiisotipo antiidiotipo de ratón para purificar los anticuerpos anti-KIR), cromatografía de hidroxapatita, cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, cromatografía de intercambio catiónico), ELISA, cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC, de sus siglas en inglés), cromatografía de exclusión por tamaño, electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE, de sus siglas en inglés), transferencia de Western, resonancia de plasmón superficial (SPR, de sus siglas en inglés), métodos de afinidad de espectroscopia de masas, cromatografía de gradiente tiofílica, diálisis, métodos de filtración y métodos de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, de sus siglas en inglés).

El cribado y selección de anticuerpos anti-KIR se puede realizar mediante cualquier técnica o combinación de técnicas adecuadas. Por ejemplo, se puede utilizar varios formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos que se unen selectivamente con una proteína en particular, variante o fragmento. Por ejemplo, los inmunoensayos de ELISA en fase sólida se utilizan de forma rutinaria para seleccionar anticuerpos que son selectivamente inmunorreactivos con una proteína, variante de proteína o fragmento de la misma. Véase Harlow y Lane, citado anteriormente. Se puede determinar la afinidad de unión del anticuerpo monoclonal, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard de Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Los anticuerpos anti-KIR normalmente se seleccionan para determinar la capacidad de modular la actividad de las células NK, tal como mediante la inhibición de las señales mediadas por KIR, la promoción de la activación de las células NK a través de NCR u otras señales mediadas por KAR, o similares. Se han desarrollado varios ensayos de células NK que pueden ser útiles en dichos contextos, incluidos, por ejemplo, los métodos de detección de citometría de flujo. Véase, por ejemplo, McGinnes et al., *J Immunol Methods* 80 1984 70-85. Los métodos relevantes para cultivar células NK, evaluar células NK y similares son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Campbell y Colonna, *Natural Killer Cell Protocols (Methods in Molecular Biology Series vol. 121)* (2000).

En el contexto de los anticuerpos anti-KIR, la actividad neutralizadora de las células NK se puede demostrar por la capacidad de un anticuerpo anti-KIR para reconstituir la lisis de células diana mediante las células NK positivas para KIR. Por ejemplo, un ensayo que involucra un anticuerpo anti-KIR que comprende una o más porciones de unión a KIR procedentes del anticuerpo DF200 puede involucrar la medición de la capacidad de los clones NK positivos para KIR2DL para lisar dianas HLA-C positivas en presencia de los anticuerpos anti-KIR en comparación con en ausencia de los anticuerpos anti-KIR. En dichos contextos, la actividad neutralizadora de un anticuerpo anti-KIR también, o alternativamente, puede definirse mediante, por ejemplo, la capacidad del anticuerpo anti-KIR para inhibir la unión de las moléculas HLA-C a los receptores KIR2DL1 y KIR2DL3 (o el KIR2DL2 estrechamente relacionado). Más particularmente, en dichos contextos, la capacidad neutralizadora se puede medir en términos de la capacidad del anticuerpo anti-KIR para inhibir la unión de una molécula HLA-C seleccionada de Cw1, Cw3, Cw7 y Cw8 (o de una molécula HLA-C que tiene un resto Asn en la posición 80) a KIR2DL2/3 y/o la unión de una molécula HLA-C seleccionada de Cw2, Cw4, Cw5 y Cw6 (o de una molécula HLA-C que tiene un resto Lys en la posición 80) a KIR2DL1.

Los cambios en la actividad de las células NK provocados por los anticuerpos anti-KIR se pueden determinar mediante un método que comprende tomar una biopsia, preparar secciones de tejido obtenidas para el análisis inmunohistoquímico, teñir el tejido para las células NK (por ejemplo, utilizando AcM específicos para CD56, NKp30, NKp46 u otros marcadores celulares específicos de NK), y cuantificar el número de células NK y la tinción conjunta de un marcador (tal como NKp44, CD25, CD69, CD86 u otro(s)) que están específicamente regulados por incremento en células NK activadas, para determinar la proporción de células NK activadas en la población. Dichas mediciones también podrían realizarse mediante análisis FACS si se preparan suspensiones celulares a partir de muestras de tejido.

La modulación de células NK asociada con anticuerpos anti-KIR (por ejemplo, inhibición de KIR) también se puede evaluar mediante diversos ensayos de citotoxicidad basados en células.

En otra variante, la modulación de la actividad de las células NK asociada con un anticuerpo anti-KIR se puede evaluar en un ensayo de liberación de citocinas, en donde las células NK se incuban con un anticuerpo anti-KIR de prueba y una línea celular diana para estimular la producción de citocinas de células NK (por ejemplo, producción de IFN- γ y/o GM-CSF). Por ejemplo, en el contexto de los anticuerpos anti-KIR, se puede utilizar una línea celular que exprese un alelo HLA-C reconocido por una molécula KIR de la población de células NK de prueba en dicho ensayo de liberación de citocinas. En un protocolo aún más particularmente ejemplar, la producción de IFN- γ a partir de PBMC se puede evaluar mediante la tinción de la superficie celular e intracitoplásmica y el análisis por citometría de flujo después de aproximadamente 4 días en cultivo. En resumen, se puede agregar Brefeldin A (Sigma Aldrich) a una concentración final de aproximadamente 5 $\mu\text{g/ml}$ durante las aproximadamente últimas 4 horas de cultivo. Luego, las células se pueden incubar con AcM anti-CD3 y anti-CD56 antes de la permeabilización (IntraPrep™; Beckman Coulter) y teñir con PE-anti-IFN- γ o PE-IgG1 (Pharmingen). La producción de GM-CSF e IFN- γ a partir de células NK activadas policlonales se puede medir en sobrenadantes utilizando ELISA (GM-CSF: DuoSet Elisa, R&D Systems, Mineápolis, MN; IFN- γ : OptE1A set, Pharmingen).

Los anticuerpos anti-KIR se pueden seleccionar en función de cualquier criterio adecuado. Por ejemplo, en un aspecto, los anticuerpos anti-KIR se seleccionan en función de la capacidad de causar al menos aproximadamente el 10 % de lisis específica mediada por células NK que muestran al menos un KIR reconocido por el anticuerpo anti-KIR y, deseablemente, al menos aproximadamente el 40 % de lisis específica, al menos aproximadamente el 50 % de lisis específica o incluso al menos aproximadamente el 70 % de lisis específica (por ejemplo, aproximadamente el 60-100 % de lisis específica), medida en un ensayo de liberación de cromo estándar, hacia una célula diana que expresa una molécula análoga HLA de clase I, en comparación con la lisis o citotoxicidad obtenida en la misma relación efector/diana con células NK que no están bloqueadas por su KIR. Como otro ejemplo ilustrativo, los anticuerpos anti-KIR procedentes de DF200 u otro anticuerpo anti-KIR se pueden seleccionar en función de la

capacidad para aumentar el nivel de citotoxicidad contra las células diana al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 35 % o más en el contexto de un ensayo de liberación de cromo realizado en presencia de células NK que expresan uno o más KIR para los cuales los anticuerpos anti-KIR son específicos.

5 En otro aspecto, la apoptosis de las células diana se puede utilizar como un indicador de la modulación de la actividad de las células NK del anticuerpo anti-KIR. La apoptosis se puede determinar mediante técnicas de análisis de ADN bien conocidas. Por ejemplo, un patrón característico de escalonamiento de ADN se reconoce como un sello
10 distintivo de la muerte celular apoptótica. Se conocen técnicas para visualizar dicha fragmentación del ADN. Dichas técnicas normalmente implican resolver el ADN fragmentado mediante electroforesis en gel de agarosa y el uso de tintes que permiten la visualización del ADN. Otra forma de confirmar la muerte celular es mediante la tinción de las células diana con azul de tripano. Una alternativa es la tinción con cristal violeta, realizada según lo descrito por Flick y Gifford (J. Immunol. Methods 68:167-175, 1984).

15 La destrucción redirigida es un sistema experimental para determinar la capacidad de un receptor de células NK para inducir citotoxicidad. Las células NK recubiertas con anticuerpo específico para un receptor candidato se evalúan por su capacidad para destruir células diana que expresan un receptor Fc al que se une el anticuerpo.

Otras actividades biológicas asociadas con diversos anticuerpos anti-KIR también se pueden utilizar para evaluar anticuerpos anti-KIR. Por ejemplo, los anticuerpos anti-KIR se pueden evaluar por su capacidad para inducir, promover y/o mejorar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Los anticuerpos IgG_{2a}, IgG₃ y algunos de la subclase IgG₁ normalmente median la ADCC, de modo que se tienen en cuenta las consideraciones de isotipo (y posiblemente las modificaciones) si se desea el funcionamiento de la ADCC. La capacidad para inducir ADCC se puede evaluar utilizando un ensayo de liberación de cromo. En resumen, una línea celular que expresa el antígeno al que se dirige la lisis por células efectoras se marca con aproximadamente 100 µCi de ⁵¹Cr durante
25 aproximadamente 1 hora antes de combinar células efectoras y anticuerpos anti-KIR en una placa de microtitulación de fondo en U. Después de la incubación durante aproximadamente 5 horas a aproximadamente 37 °C, los sobrenadantes se pueden recoger y analizar para determinar la radioactividad. La citotoxicidad se puede calcular mediante la fórmula: % de lisis = $[(\text{CPM experimental}) - (\text{CPM de fuga diana})] / [(\text{CPM de lisis con detergente}) - (\text{CPM de fuga diana})] \times 100 \%$. La lisis específica se puede calcular utilizando la fórmula: Lisis específica - (% de lisis con anticuerpo) - (% de lisis sin anticuerpo).
30

Los anticuerpos anti-KIR también, o alternativamente, se pueden seleccionar en función de su capacidad para proporcionar o no la fijación del complemento y/o inducir, promover y/o mejorar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Hay una serie de isotipos de anticuerpos que son capaces de la fijación del complemento y CDC, incluyendo, sin limitación, los siguientes: IgM murina, IgG2a murina, IgG2b murina, IgG3 murina, IgM humana, IgG1 humana e IgG3 humana. Aquellos isotipos que no incluyen, sin limitación, IgG2 humana e IgG4 humana. La determinación de isotipos y otros métodos para modificar la fijación del complemento y las características funcionales de la CDC de los anticuerpos son conocidos en la técnica.
35

40 Los ensayos ADCC y CDC adicionales y los principios relacionados se describen en, por ejemplo, la Patente de EE.UU. 5.500.362.

Los anticuerpos anti-KIR también se pueden seleccionar en función de su capacidad para inducir, promover y/o mejorar la activación del complemento. Los anticuerpos de las clases IgG₃, IgG_{2a} e IgM normalmente se unen y activan el complemento sérico. Si se desean dichas funciones, se pueden hacer consideraciones y/o ajustes apropiados de isotipos. Los ensayos de unión de complemento son conocidos en la técnica y generalmente implican la incubación de células diana con anticuerpos anti-KIR candidatos, lavado, contacto con complemento, incubación y adición de azul de tripano u otra matriz apropiada para permitir la medición del número de células y la evaluación de la integridad del plasma celular.
45
50

Los anticuerpos anti-KIR también se pueden evaluar en función de su capacidad para inducir, promover y/o mejorar la fagocitosis. Se conocen ensayos de fagocitosis. Como ejemplo, las células diana se pueden marcar con el colorante fluorescente rojo lipofílico PKH 26. Las células con capa leucocitaria purificadas a partir de células efectoras heparinizadas que contienen sangre completa se pueden incubar con las dianas marcadas a aproximadamente 37 °C durante aproximadamente 6 horas en ausencia o en presencia de anticuerpos anti-KIR. Las células efectoras se pueden teñir después con el anticuerpo marcado con FITC (isotiocianato de fluoresceína), que se une a la célula efectora a 0 °C. Las células normalmente se lavan y analizan posteriormente utilizando fluorescencia de dos colores mediante FACScan u otro método de escaneo. El porcentaje de fagocitosis se expresa como el porcentaje de células efectoras (células NK, monocitos, neutrófilos o macrófagos) asociado con una tinción PKH 26.
55
60

Los anticuerpos anti-KIR se pueden proporcionar en una composición homogénea o en combinación con otros ingredientes activos y/o inertes.
65

Los anticuerpos anti-KIR se utilizan normalmente y se proporcionan en una forma al menos sustancialmente pura.

Una molécula sustancialmente pura es una molécula que es la especie predominante en la composición en la que se encuentra con respecto a la clase de moléculas a la que pertenece (por ejemplo, un anticuerpo sustancialmente puro es la especie de proteína predominante en la composición en la que se encuentra). Una especie sustancialmente pura constituye al menos aproximadamente el 50 % del tipo de molécula en la composición y normalmente constituirá al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o mayor porcentaje de las especies en la composición en peso. De manera habitual, una composición que comprende un anticuerpo anti-KIR exhibirá al menos aproximadamente el 98 %, 98 % o 99 % de homogeneidad para el anticuerpo anti-KIR en el contexto de todas las especies de péptidos presentes en la composición o al menos con respecto a las especies peptídicas substancialmente activas en el contexto de uso propuesto. Por ejemplo, un estabilizador/tampón peptídico tal como una albúmina se puede incluir intencionalmente en una formulación farmacéutica final, sin impedir la actividad de los anticuerpos anti-KIR, y, por consiguiente, se puede excluir de dichos cálculos de pureza. La presencia de impurezas que no interfieran con la actividad fundamental también puede ser aceptable en el contexto de una composición sustancialmente pura. La pureza se puede medir mediante métodos apropiados para el compuesto dado (por ejemplo, métodos cromatográficos; electroforesis en gel de agarosa y/o poliacrilamida; análisis por HPLC; etc.).

Una molécula aislada se refiere a una molécula que no está asociada con niveles significativos (por ejemplo, más de aproximadamente el 1 %, más de aproximadamente el 2 %, más de aproximadamente el 3 % o más de aproximadamente el 5 %) de cualquier molécula biológica extraña e indeseable, tales como moléculas biológicas de anticuerpos no anti-KIR contenidas dentro de una célula, cultivo celular, medios químicos o animales en los que se produjo el anticuerpo anti-KIR. Una molécula aislada también se refiere a cualquier molécula que haya pasado por dicha etapa de pureza debido a la intervención humana (ya sea automática, manual o ambas) durante una cantidad significativa de tiempo (por ejemplo, al menos unos 10 minutos, al menos aproximadamente 20 minutos, al menos aproximadamente una hora o más). En muchas de las diversas composiciones proporcionadas por la invención, tales como en una composición que comprende uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, un anticuerpo anti-KIR puede estar presente en cantidades relativamente pequeñas en términos de números de especies moleculares totales en la composición (por ejemplo, en el caso de una composición que comprende una gran cantidad de un vehículo, estabilizador y/o conservante farmacéuticamente aceptable). En algunos casos, se pueden incluir péptidos adicionales, tales como BSA, en dicha composición con un anticuerpo anti-KIR previamente purificado. Sin embargo, siempre que dichos constituyentes adicionales de la composición sean aceptables para la aplicación prevista del anticuerpo anti-KIR, dicha composición todavía se puede describir como que comprende un anticuerpo anti-KIR aislado. En otras palabras, el término "aislado" no pretende excluir mezclas artificiales o sintéticas con otros compuestos o materiales, tales como los que pueden formar parte de una preparación farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, los anticuerpos anti-KIR están sustancialmente libres de otras moléculas de unión a NKCAMR y/o moléculas de unión a STM.

En otro aspecto, la composición comprende varios anticuerpos anti-KIR con especificidades y características diferentes (por ejemplo, un "cóctel" de anticuerpos anti-KIR que tienen características de especificidad y/o selectividad diferentes).

Las composiciones de anticuerpos anti-KIR para su uso farmacéutico normalmente contienen al menos una cantidad fisiológicamente eficaz y habitualmente contienen de manera deseable una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-KIR, combinación de anticuerpos anti-KIR o anticuerpos anti-KIR y agentes activos/terapéuticos adicionales.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto o composición biológicamente activo que, cuando se administra en dosis apropiadas y durante períodos de tiempo apropiados a un hospedador que normalmente responde al compuesto o composición, es suficiente para lograr un resultado terapéutico deseado en un hospedador y/o normalmente ser capaz de lograr dicho resultado terapéutico en hospedadores sustancialmente similares (por ejemplo, pacientes que tienen características similares a un paciente a tratar). Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-KIR puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo y de la capacidad del anticuerpo anti-KIR para desencadenar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o parte del anticuerpo se ve compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Los efectos terapéuticos a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, (a) una reducción en la gravedad de una enfermedad, un trastorno o una afección relacionada en un sujeto particular o una población de un sujeto sustancialmente similar; (b) una reducción en uno o más síntomas o afecciones fisiológicas asociadas con una enfermedad, trastorno o afección; o (c) un efecto profiláctico. Una reducción de la gravedad de una enfermedad puede incluir, por ejemplo, (a) una reducción medible en la propagación de un trastorno (por ejemplo, la propagación de un cáncer en un paciente); (b) un aumento en la posibilidad de un resultado positivo en un sujeto (por ejemplo, un aumento de al menos aproximadamente el 5 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 % o más); (c) una mayor probabilidad de supervivencia o vida útil; y/o (d) una reducción medible en uno o más biomarcadores asociados con la presencia del estado de la enfermedad (por ejemplo, una reducción en la cantidad y/o el tamaño de los tumores en el contexto del tratamiento del cáncer; una reducción en la carga vírica en el contexto de un

tratamiento de infección por virus; etc.). Una cantidad terapéuticamente eficaz se puede medir en el contexto de un sujeto individual o, más habitualmente, en el contexto de una población de sujetos similares sustanciales (por ejemplo, un número de pacientes humanos con un trastorno similar inscritos en un ensayo clínico que implica una composición de anticuerpos anti-KIR o una serie de mamíferos no humanos que tienen un conjunto similar de características que se utilizan para probar un anticuerpo anti-KIR en el contexto de experimentos preclínicos).

Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto o composición activa que es eficaz, en las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, en un hospedador normalmente sensible a dicho compuesto o composición, para lograr un resultado profiláctico deseado en un hospedador o es capaz de lograr normalmente dichos resultados en hospedadores sustancialmente similares. Los efectos profilácticos a modo de ejemplo incluyen una reducción en la probabilidad de desarrollar un trastorno, una reducción en la intensidad o la propagación de un trastorno, un aumento en la probabilidad de supervivencia durante un trastorno inminente, un retraso en el inicio de una enfermedad, una disminución en la propagación de una afección inminente en comparación con pacientes similares que no reciben el régimen profiláctico, etc. Normalmente, debido a que se utiliza una dosis profiláctica en sujetos antes de o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz para un anticuerpo anti-KIR particular. Un efecto profiláctico también puede incluir, por ejemplo, una prevención de la aparición, un retraso en el tiempo de aparición, una reducción de la gravedad consiguiente de la enfermedad en comparación con un sujeto sustancialmente similar que no recibe la composición del anticuerpo anti-KIR, etc.

Una cantidad fisiológicamente eficaz es una cantidad de un agente activo que, al administrarse a un hospedador que normalmente responde a dicho agente, produce la inducción, promoción y/o mejora de al menos un efecto fisiológico asociado con la modulación de la actividad de las células NK (por ejemplo, aumento en la apoptosis asociada a células NK; aumento en la secreción de IFN γ asociada a células NK; etc.).

"Tratamiento" se refiere a la administración de una cantidad eficaz de un compuesto terapéuticamente activo de la invención con el propósito de prevenir que se desarrollen síntomas o estados patológicos o con el propósito de aliviar, mejorar o erradicar (curar) dichos síntomas o estados patológicos ya desarrollados. Por lo tanto, el término "tratamiento" incluye el tratamiento profiláctico. Sin embargo, se entenderá que los regímenes terapéuticos y los regímenes profilácticos de la invención también se pueden considerar aspectos separados e independientes de la presente invención.

A. Vehículos farmacéuticamente aceptables

Un anticuerpo anti-KIR se puede combinar con uno o más vehículos (diluyentes, excipientes y similares) y/o adyuvantes apropiados para una o más rutas de administración deseadas para proporcionar composiciones que sean farmacéuticamente aceptables.

Los anticuerpos anti-KIR se pueden, por ejemplo, mezclar con lactosa, sacarosa, polvos (por ejemplo, polvo de almidón), ésteres de celulosa de ácidos alcanoicos, ácido esteárico, talco, estearato de magnesio, óxido de magnesio, sales de sodio y calcio de ácidos fosfórico y sulfúrico, goma arábiga, gelatina, alginato de sodio, polivinilpirrolidina y/o alcohol polivinílico y, opcionalmente, comprimidos o encapsulados para la administración convencional. Como alternativa, un anticuerpo anti-KIR u otro anticuerpo anti-KIR se puede disolver en solución salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, soluciones coloidales de carboximetilcelulosa, etanol, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, goma de tragacanto y/o diversos tampones. Otros vehículos, adyuvantes y modos de administración son bien conocidos en las técnicas farmacéuticas. Un vehículo o diluyente puede incluir material de retardo, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solo o con una cera, u otros materiales funcionalmente similares.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables generalmente incluyen todos y cada uno de los disolventes adecuados, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles con un anticuerpo anti-KIR. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de cualquiera de ellos. En muchos casos, puede ser deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en dicha composición. Sustancias farmacéuticamente aceptables tales como agentes humectantes o cantidades menores de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o agentes emulsionantes, conservantes o tampones, pueden deseablemente mejorar la vida útil o la eficacia del anticuerpo anti-KIR, la composición relacionada o la combinación. La idoneidad para los vehículos y otros componentes de las composiciones farmacéuticas se determina en función de la falta de un impacto negativo significativo en las propiedades biológicas deseadas del anticuerpo anti-KIR, la composición relacionada o la combinación (por ejemplo, menos que un impacto sustancial (10 % o menos de inhibición relativa, 5 % o menos de inhibición relativa, etc.) en la unión a NKCAMR y STM en el caso de un fragmento de anticuerpo anti-KIR.

Las composiciones de anticuerpos anti-KIR, composiciones relacionadas y combinaciones de acuerdo con la invención pueden estar en varias formas adecuadas. Dichas formas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación

líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, emulsiones, microemulsiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas, dendrímeros y otras nanopartículas (véase, por ejemplo, Baek et al., *Methods Enzymol.* 2003;362:240-9; Nigavekar et al., *Pharm Res.* Marzo de 2004;21(3):476-83), micropartículas y supositorios. La forma óptima para cualquier composición asociada con el anticuerpo anti-KIR depende del modo de administración deseado, la naturaleza de la composición o combinación y la aplicación terapéutica u otro uso previsto. Las formulaciones también pueden incluir, por ejemplo, polvos, pastas, pomadas, gelatinas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (catiónicos o aniónicos), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones de aceite en agua y agua en aceite, emulsiones, de Carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen Carbowax. Cualquiera de las mezclas anteriores puede ser apropiada en tratamientos y terapias de acuerdo con la presente invención, siempre que la unión del anticuerpo anti-KIR a su(s) diana(s) peptídica(s) asociada(s) a $\gamma 2$ DIII no sea significativamente inhibida y/o la actividad biológica de la(s) molécula(s) relacionada(s) se inhiban significativamente por la formulación y la formulación sea fisiológicamente compatible y tolerable con la vía de administración. Véase también, por ejemplo, Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" *PDA J Pharm Sci Technol.* 52:238-311 (1998) y las citas en el mismo para obtener información adicional relacionada con excipientes y vehículos bien conocidos por los químicos farmacéuticos.

En un aspecto particular, los anticuerpos anti-KIR se administran en liposomas (inmunoliposomas). En otro aspecto, los anticuerpos anti-KIR se administran en liposomas y un agente secundario, como un ARN antisentido, ARNi o ARNip para suprimir un gen en una célula NK, o toxinas o medicamentos para la destrucción dirigida de células NK (agentes secundarios adicionales para terapias de combinación se describen en otra parte del presente documento). La producción de liposomas es bien conocida en la técnica. Los inmunoliposomas también se pueden dirigir a células particulares mediante técnicas estándar.

Las composiciones de anticuerpos anti-KIR también incluyen composiciones que comprenden cualquier combinación adecuada de un péptido de anticuerpo anti-KIR y una sal adecuada para el mismo. Cualquier sal adecuada, tal como una sal de metal alcalinotérreo en cualquier forma adecuada (por ejemplo, una sal tampón), se puede utilizar en la estabilización de anticuerpos anti-KIR (preferentemente la cantidad de sal es tal que se evita la oxidación y/o precipitación del anticuerpo anti-KIR). Las sales adecuadas incluyen normalmente cloruro de sodio, succinato de sodio, sulfato sódico, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, sulfato de magnesio y cloruro de calcio. En un aspecto, se utiliza una sal de aluminio para estabilizar un anticuerpo anti-KIR en una composición de la invención, pudiendo la sal de aluminio servir también como adyuvante cuando dicha composición se administra a un paciente. También se proporcionan composiciones que comprenden una base y anticuerpos anti-KIR. En otros aspectos, la invención proporciona una composición de anticuerpos anti-KIR que esencialmente carece de una cantidad tonificante de cualquier sal.

Normalmente, las composiciones en forma de soluciones inyectables o infusibles, tales como composiciones similares a las utilizadas para la inmunización pasiva de seres humanos con otros anticuerpos, se utilizan para la administración de los anticuerpos anti-KIR. Un modo normal para la administración de composiciones de anticuerpos anti-KIR es mediante administración parenteral (por ejemplo, administración intravenosa, subcutánea, intraperitoneal y/o intramuscular). En un aspecto, se administra un anticuerpo anti-KIR a un paciente humano mediante infusión o inyección intravenosa. En otro aspecto, se administra un anticuerpo anti-KIR mediante inyección intramuscular o subcutánea. Como se indicó anteriormente, la administración intratumoral también puede ser útil en ciertos regímenes terapéuticos.

Por consiguiente, los anticuerpos anti-KIR, tales como los anticuerpos anti-KIR, pueden formularse en, por ejemplo, formulaciones sólidas (que incluyen, por ejemplo, gránulos, polvos, partículas de proyectil o supositorios), formas semisólidas (geles, cremas, etc.) o formas líquidas (por ejemplo, soluciones, suspensiones o emulsiones). Los anticuerpos y otros anticuerpos anti-KIR pueden aplicarse en varias soluciones. Las soluciones adecuadas para su uso de acuerdo con la invención son normalmente estériles, disuelven cantidades suficientes del anticuerpo y otros componentes de la composición (por ejemplo, una citocina inmunomoduladora tal como GM-CSF, IL-2 y/o KGF), estables en condiciones para la fabricación y almacenamiento, y no son perjudiciales para el sujeto para la aplicación propuesta. Un anticuerpo anti-KIR puede someterse a operaciones farmacéuticas convencionales tales como esterilización y/o pueden contener adyuvantes convencionales, tales como conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, tampones, etc. Una composición también se puede formular como una solución, microemulsión, dispersión, polvo, macroemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para la alta concentración de fármaco. Se pueden mantener las propiedades de fluidez deseables de una solución, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Se puede lograr la absorción prolongada de composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina. Estos y otros componentes de una composición farmacéuticamente aceptable de la invención pueden impartir propiedades ventajosas tales como transferencia, administración, tolerancia y similares mejoradas.

Una composición para uso farmacéutico también puede incluir varios diluyentes, cargas, sales, tampones, detergentes (por ejemplo, un detergente no iónico, tal como Tween-80), estabilizadores (por ejemplo, aminoácidos

libres de proteínas o azúcares), conservantes, fijadores de tejidos, solubilizantes y/u otros materiales adecuados para su inclusión en una composición para su uso farmacéutico. Ejemplos de componentes adecuados también se describen en, por ejemplo, Berge et al., J. Pharm. Sci., 6661, 1-19 (1977); Wang y Hanson, J. Parenteral. Sci. Tech: 42, S4-S6 (1988); las patentes de EE.UU. 6.165.779 y 6.225.289; y otros documentos citados en el presente documento. Dicha composición farmacéutica también puede incluir conservantes, antioxidantes u otros aditivos conocidos por los expertos en la técnica. Otros vehículos farmacéuticamente aceptables son conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, Ur-quhart et al., Lancet, 16, 367 (1980), Lieberman et al., Pharmaceutical Dosage Forms-Disperse Systems (2ª ed., vol. 3, 1998); Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms & Drug Delivery Systems (7ª ed. 2000); Martindale, The Extra Pharmacopeia (31ª edición), Remington's Pharmaceutical Sciences (16ª-20ª ediciones); The Pharmacological Basis Of Therapeutics, Goodman y Gilman, Eds. (9ª ed.-1996); Wilson and Gisvolds' Textbook Of Organic Medicinal And Pharmaceutical Chemistry, Delgado y Remers, Eds. (10ª ed. - 1998) y las patentes de EE.UU. 5.708.025 y 5.994.106. Los principios de formulación de composiciones farmacéuticamente aceptables también se describen en, por ejemplo, Platt, Clin. Lab Med., 7:289-99 (1987), Aulton, Pharmaceutics: The Science Of Dosage Form Design, Churchill Livingstone (Nueva York) (1988), Extemporaneous Oral Liquid Dosage Preparations, CSHP (1998) y "Drug Dosage", J. Kans. Med. Soc., 70 (I), 30-32 (1969). Otros vehículos farmacéuticamente aceptables, particularmente adecuados para la administración de composiciones de anticuerpos anti-KIR y composiciones relacionadas (por ejemplo, composiciones que comprenden ácidos nucleicos que codifican anticuerpos anti-KIR o vectores que comprenden ácidos nucleicos que codifican anticuerpos anti-KIR) se describen en, por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 98/32859.

Las composiciones de anticuerpos anti-KIR se pueden preparar con un vehículo que protegerá el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biocompatibles y biodegradables, tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico, y combinaciones de cualquiera de ellos, para proporcionar dicha composición. Se conocen métodos para la preparación de dichas composiciones. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

En otro aspecto, las composiciones de la invención se administran por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un transportador comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se desea) también puede atraparse en una cápsula de gelatina de vaina dura o blanda, compactarse formando comprimidos o incorporarse directamente a la dieta del sujeto. Para la administración terapéutica oral, los compuestos pueden incorporarse con excipientes y utilizarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Para administrar un compuesto por una vía distinta a la administración parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto o administrarlo conjuntamente con, un material para impedir su inactivación.

En el caso de composiciones de combinación (tratadas más adelante en el presente documento), los anticuerpos anti-KIR se pueden coformular y/o coadministrar con uno o más agentes terapéuticos adicionales (por ejemplo, un péptido antigénico y/o una citocina inmunoestimuladora). Dichas terapias de combinación pueden requerir dosis más bajas del anticuerpo anti-KIR y/o los agentes coadministrados, evitando de este modo posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

B. Composiciones y terapias de combinación

La invención se refiere además a una composición farmacéuticamente aceptable que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-KIR2DL con reactividad cruzada con KIR2DL1 y KIR2DL2/3 o fragmento de unión del mismo para su uso en el tratamiento del cáncer en combinación con una interleucina-2. En consecuencia, la composición comprende uno o más anticuerpos anti-KIR en combinación con uno o más agentes activos adicionales (agentes que inducen, promueven y/o mejoran una respuesta biológica en al menos una proporción sustancial de una población hospedadora diana de una manera predecible).

1. Combinaciones generales

Las composiciones de combinación de anticuerpos anti-KIR ("composiciones de combinación") comprenden IL-21.

2. Composiciones de combinación para el tratamiento del cáncer

Los fármacos empleados en la terapia del cáncer pueden tener un efecto citotóxico o citostático en las células cancerosas, o pueden reducir la proliferación de las células malignas. Entre los textos que proporcionan orientación para la terapia del cáncer se encuentra Cancer, Principles and Practice of Oncology, 4ª Edición, DeVita et al., Eds. J. B. Lippincott Co., Filadelfia, Pa. (1993). Un enfoque terapéutico apropiado se elige de acuerdo con factores tales como el tipo particular de cáncer y el estado general del paciente, como se reconoce en el campo pertinente.

AcM contra el cáncer

Los ejemplos de AcM secundarios contra el cáncer adecuados incluyen AcM anti-CD20 (como Rituximab y HuMax-

CD20), AcM anti-Her2 (por ejemplo, Trastuzumab), AcM anti-CD52 (por ejemplo, Alemtuzumab y Campath® 1H), AcM anti-EGFR (por ejemplo, Cetuximab, HuMax-EGFr y ABX-EGF), Zamy, Pertuzumab, anticuerpos anti-A33 (véase la patente de EE.UU. 6.652.853), AcM de proteína antioncofetal (véase la patente de EE.UU. 5.688.505), AcM anti-PSMA (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 6.649.163), anticuerpos anti-TAG-72 (véase la patente de EE.UU. 6.207.815), anticuerpos antiaminofosfolípidos (véase la patente de EE.UU. 6.406.693), anticuerpos antineurotrofina (Patente de EE.UU. 6.548.062), anticuerpos anti-C3b(i) (véase la patente de EE.UU. 6.572.856), anticuerpos anti-MN (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 6.051.226), AcM anti-mts1 (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 6.638.504) y AcM anti-VEGF (por ejemplo, bevacizumab). Otras posibles moléculas de AcM secundarios adecuadas incluyen alemtuzumab, edrecolomab, tositumomab, lbritumomab tiuxetan y gemtuzumab ozogamicina. Los anticuerpos adicionales que pueden ser componentes útiles de composiciones de combinación o métodos de administración de combinación incluyen anticuerpos contra el factor tisular y anticuerpos contra el receptor tipo Ig de linfocitos citolíticos (anticuerpos anti-KIR). Cuando sea apropiado, las dianas para estos anticuerpos también se pueden dirigir mediante anticuerpos anti-KIR multiespecíficos de la invención. Cuando sea apropiado, dichos anticuerpos se pueden conjugar con una citoxina, radionúclido u otro agente anticancerígeno. También cuando sea apropiado, las dianas peptídicas inmunogénicas de dichos anticuerpos se pueden utilizar para inducir una respuesta inmunitaria en una composición de combinación o un método de administración de combinación de la invención. La IL-20, anticuerpos de la misma y anticuerpos antiidiotípicos relacionados también pueden ser componentes útiles en dichas composiciones.

Otros anticuerpos desarrollados contra linfomas, células de leucemia, micrometástasis y tumores sólidos también pueden ser útiles en métodos de combinación y/o composiciones de combinación. Anticuerpos que inhiben funciones vitales para la supervivencia, el crecimiento, la invasividad y/o la migración de las células tumorales; anticuerpos que inducen ADCC o CDC contra células tumorales/cancerosas; anticuerpos que interrumpen eventos clave de señalización relacionados con la progresión del cáncer; y/o que suministran una carga útil tóxica a células preneoplásicas y/o neoplásicas pueden ser particularmente útiles en dichos métodos y composiciones. La muerte de las células tumorales también podría conducir a la liberación de antígenos tumorales que "vacunan" el sistema inmunitario y lo estimulan para producir una respuesta secundaria que luego se dirige a las células tumorales/cancerosas. Por consiguiente, una población particular de células o tumor(es) cancerosos puede dirigirse, seguida por el monitoreo del paciente para una respuesta secundaria, y proporcionar una terapia adicional contra el cáncer si dicha respuesta secundaria se considera insatisfactoria. Los oncogenes sobreexpresados y los antígenos específicos de tumores pueden ser dianas ventajosas para dichos anticuerpos. Los antígenos tumorales, que pueden ser útiles en el presente contexto o por derecho propio como péptidos inmunogénicos ("vacunas") se describen en, por ejemplo, Tumor antigens recognized by T cells and antibodies. Ed. Stauss et al. (Taylor and Francis, 2003) y Durrant et al., Expert Opin. Emerging Drugs 8(2):489-500 (2003).

En otro aspecto, los anticuerpos secundarios no son similares a los anticuerpos NKCAMR, tales como los anticuerpos anti-HER-2/neu, los anticuerpos anti-PSAn, etc. Otros ejemplos de dichos anticuerpos se describen en otra parte en el presente documento. En otro aspecto, una composición de combinación y/o un método de administración de combinación implican un anticuerpo anti-KIR antiidiotípico o anticuerpo anti-antiidiotípico solo o además de un anticuerpo anti-KIR.

Citocinas contra el cáncer

El anticuerpo anti-KIR se combina con IL-21. Como se indica en otra parte del presente documento, los métodos que implican ácidos nucleicos que codifican péptidos de origen natural se pueden realizar alternativamente o adicionalmente mediante "activación génica" y técnicas de regulación por aumento de genes de recombinación homóloga, como las que se describen en las patentes de EE.UU. 5.968.502, 6.063.630 y 6.187.305 y la publicación de patente europea 0 505 500. En dichos aspectos, un anticuerpo anti-KIR puede ser "administrado" a una célula por un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-KIR o un vector o célula que comprende el mismo.

3. Aplicaciones terapéuticas

Los anticuerpos anti-KIR pueden ser útiles en varios regímenes terapéuticos y profilácticos que incluyen, por ejemplo, el tratamiento del cáncer, las infecciones víricas y los trastornos relacionados con el sistema inmunitario.

A. Reducción de la progresión del cáncer

En un aspecto ejemplar, la progresión del cáncer se reduce en un hospedador mamífero, tal como un paciente humano, que tiene un nivel detectable de células cancerosas que comprende administrar un anticuerpo anti-KIR, una composición de anticuerpos anti-KIR o una composición relacionada (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-KIR), en una cantidad suficiente para reducir de forma detectable la progresión del cáncer en el hospedador.

Las células cancerosas son células que se dividen y reproducen de manera anormal con un crecimiento incontrolado (por ejemplo, al exceder el "límite de Hayflick" del crecimiento celular normal (como se describe en, por ejemplo, Hayflick, Exp. Cell Res., 37.614 (1965)). Los "cánceres" generalmente consisten en uno o varios clones de células

que son capaces de un crecimiento parcialmente independiente en un hospedado (por ejemplo, un tumor benigno) o un crecimiento completamente independiente en un hospedador (cáncer maligno). Las células cancerosas surgen de las células hospedadoras a través de la transformación neoplásica ("carcinogénesis").

5 Términos tales como "preneoplásico", "pre maligno" y "precanceroso" con respecto a la descripción de células y/o tejidos en el presente documento se refieren a células o tejidos que tienen un perfil genético y/o fenotípico que significa un potencial significativo de convertirse en cancerosos. Por lo general, dichas células se pueden caracterizar por una o más diferencias con respecto a sus homólogas no neoplásicas más cercanas que señalan el inicio de la progresión del cáncer o un riesgo significativo para el inicio de la progresión del cáncer. Dichos cambios precancerosos, si son detectables, generalmente se pueden tratar con excelentes resultados. En consecuencia, la administración de anticuerpos anti-KIR a dichas células y tejidos como parte de un régimen profiláctico es un aspecto importante de la invención. Algunos cánceres tienen precursores precáncer bien definidos, otros no. En general, un estado precanceroso estará asociado con la incidencia de neoplasias o lesiones preneoplásicas. Los ejemplos de tejidos preneoplásicos conocidos y probables incluyen crecimientos de carcinoma ductal *in situ* (CDIS) en cáncer de mama, neoplasia intraepitelial cervical (NIC) en cáncer cervical, pólipos adenomatosos de colon en cánceres colorrectales, hiperplasia adenomatosa atípica en cáncer de pulmón y queratosis actínica (QA) en cánceres de piel. Se han caracterizado los fenotipos y genotipos preneoplásicos para varios tipos de cáncer y los métodos para evaluar la existencia de un estado preneoplásico en las células. Véase, por ejemplo, Medina, J Mammary Gland Biol Neoplasia. Octubre de 2000;5(4):393-407; Krishnamurthy et al., Adv Anat Pathol. Mayo de 2002;9(3):185-97; Ponten, Eur J Cancer. Octubre de 2001;37 Supl 8:S97-113; Niklinski et al., Eur J Cancer Prev. Junio de 2001;10(3):213-26; Walch et al., Pathobiology. enero-febrero de 2000; 68(1): 9-17; y Busch, Cancer Surv. 1998;32:149-79. Los perfiles de expresión génica se pueden utilizar cada vez más para diferenciar entre células normales, precancerosas y cancerosas. Por ejemplo, los genes de poliposis adenomatosa familiar provocan una estrecha vigilancia del cáncer de colon; el gen supresor de tumores p53 mutado marca las células que probablemente desarrollarán cánceres agresivos; los niveles de expresión de osteopontina están elevados en las células premalignas y el aumento de la actividad de la telomerasa también puede ser un marcador de una afección precancerosa (por ejemplo, en los cánceres de vejiga y pulmón).

30 "Progresión del cáncer" se refiere a cualquier evento o combinación de eventos que promueven, o que son indicativos de, la transición de una célula normal no neoplásica a una célula cancerosa neoplásica, la migración de dichas células neoplásicas y la formación y crecimiento de tumores a partir de las mismas (este último aspecto se puede denominar progresión tumoral). Los ejemplos de dichos eventos incluyen cambios celulares fenotípicos asociados con la transformación de una célula normal no neoplásica a un fenotipo preneoplásico reconocido, y cambios fenotípicos celulares que indican la transformación de una célula preneoplásica en una célula neoplásica.

35 Los aspectos de la progresión del cáncer (también conocidos en el presente documento como "etapas de progresión del cáncer") incluyen crisis celulares, inmortalización y/o falla apoptótica normal, proliferación de células inmortalizadas y/o preneoplásicas, transformación (es decir, cambios que permiten que la célula inmortalizada exhiba crecimiento independiente del anclaje, independiente del suero y/o independiente del factor de crecimiento o independiente de la inhibición por contacto, o que se asocie con cambios en la forma indicativa de cáncer, aneuploidía y formación de focos), proliferación de células transformadas, desarrollo de potencial metastásico, migración y metástasis (p. ej., la disociación de la célula de una ubicación y reubicación a otro sitio), formación de colonias nuevas, formación de tumores, crecimiento tumoral, neotumorogénesis (formación de nuevos tumores en una ubicación distinguible y que no está en contacto con la fuente de la(s) célula(s) transformada(s)) y combinaciones de las mismas.

50 La carcinogénesis se asocia normalmente con la activación de genes que regulan el crecimiento celular mediante la omisión de los controles reguladores de la célula hospedadora (por ejemplo, la omisión o la superación de la(s) vía(s) de señalización apoptótica normalmente activa de la célula hospedadora y la expresión reducida de los genes supresores de tumores. Los genes múltiples normalmente se desregulan en asociación con el desarrollo de tumores totalmente malignos.

55 La progresión del cáncer a menudo también, o alternativamente, se describe por las etapas generales de iniciación, promoción y progresión. En los cánceres formadores de tumores, por ejemplo, la progresión del cáncer a menudo se describe en términos de iniciación del tumor, promoción del tumor, conversión maligna y progresión del tumor (véase, por ejemplo, Cancer Medicine, 5ª edición (2000) B.C. Decker Inc., Hamilton, Ontario, Canada (Blast et al. eds.)). La iniciación del tumor, que refleja la presencia de cambios morfológicos, genéticos y/o de comportamiento a nivel celular o tisular (por ejemplo, la inducción de mitogénesis, proliferación de células compensadoras, preneoplasia e hiperplasia, supervivencia de células premalignas o malignas (inmortalización, inmunosupresión) y la aparición de efectos asociados con el cáncer en el potencial metastásico, etc.), normalmente resulta de daños genéticos irreversibles, tales como mutaciones inducidas por carcinógenos. La etapa de inicio normalmente se caracteriza por la conversión de una célula normal a una célula iniciada en respuesta a agentes que dañan el ADN. La promoción del tumor comprende la expansión clonal selectiva de las células iniciadas. La progresión tumoral comprende la expresión del fenotipo maligno y la tendencia de las células ya malignas a adquirir características más agresivas con el tiempo. La etapa de promoción normalmente se caracteriza por la transformación de una célula iniciada en una población de células preneoplásicas, debido a alteraciones en la expresión génica y la proliferación

celular. La etapa de progresión normalmente se caracteriza por la transformación de las células preneoplásicas en una población de células neoplásicas como resultado de alteraciones genéticas adicionales.

5 Los términos tales como transformación neoplásica o conversión neoplásica también pueden describir una etapa de la progresión del cáncer. La conversión neoplásica es la transformación de una célula preneoplásica en una que expresa un fenotipo neoplásico. Una vez que se completa la conversión neoplásica, las células con estructura génica alterada necesitan multiplicarse para expresar la estructura génica asociada al cáncer. La duplicación celular determina la tasa de expresión y el riesgo asociado de cáncer. Los eventos epigenéticos en general, y la metilación del ADN en particular, se asocian con cambios moduladores de un estado normal a preneoplásico y a neoplásico. La transformación neoplásica también está asociada con la activación de genes reguladores del crecimiento, como los receptores del factor de crecimiento (por ejemplo, erbA, erbB, fms, neu); moléculas implicadas en la transducción de señales (src, abl, ras); y factores de transcripción (jun, fos, myc), que a menudo se denominan oncogenes celulares o "oncogenes (c)". Los factores adicionales implicados en la transformación neoplásica incluyen genes que inhiben el crecimiento (por ejemplo, p53 y Rb) y genes que regulan la apoptosis, tal como bcl-2. La transformación neoplásica también implica la activación inapropiada de genes que controlan el crecimiento celular.

20 En otra etapa de la progresión del cáncer, los tumores inmunogénicos normalmente escapan de la vigilancia inmunitaria del hospedador permitiendo su crecimiento. Los aspectos adicionales relacionados con la progresión del cáncer incluyen la evasión de la apoptosis por parte de la célula cancerosa, logrando un potencial de replicación ilimitado, logrando la autosuficiencia en la expresión del factor de crecimiento, logrando una insensibilidad anormal a las señales de crecimiento; logrando angiogénesis sostenida y metástasis.

25 La metástasis se refiere a la diseminación de células cancerosas de un sitio en un medio a otro, tal como en el tejido de un paciente. La metástasis también suele estar implicada con varios eventos fisiológicos distintos, que incluyen el escape de las células cancerosas de un sitio inicial a través de los canales linfáticos o la actividad de la proteasa; la supervivencia de las células cancerosas en circulación; la parada en sitio(s) secundario(s); extravasación en el tejido circundante; inicio y mantenimiento del crecimiento y vascularización de tumores metastásicos. La metástasis también puede implicar la capacidad de las células tumorales para secretar proteasas que permiten la invasión más allá de la ubicación inmediata del tumor primario. Una característica prominente del fenotipo maligno es la propensión a la inestabilidad genómica y el crecimiento incontrolado.

30 Las células cancerosas metastásicas normalmente penetran en la matriz extracelular (ECM, de sus siglas en inglés) y la membrana basal de los vasos sanguíneos para metastatizar a un órgano diana (sitio ectópico). La EMC consiste en proteínas integradas en un complejo de hidratos de carbono (heparan sulfato peptidoglicanos), y las proteasas que rodean a un tumor son activas en esta descomposición del tejido del hospedador. Por consiguiente, la penetración en la ECM y las membranas basales y la degradación de los tejidos del hospedador relacionados también son aspectos relevantes de la progresión del cáncer. De hecho, a menudo hay una mezcla compleja de los procesos normalmente consecutivos de unión celular, desprendimiento, así como la degradación de las proteínas de la matriz extracelular y la migración, que es necesaria para la locomoción de células tumorales invasivas a lugares distantes. Todas estas actividades son aspectos importantes de la progresión del cáncer en el contexto de la presente invención. Por consiguiente, por ejemplo, la administración de un anticuerpo anti-KIR, un compuesto relacionado o una composición de combinación se puede utilizar como un medio para reducir una cualquiera de estas actividades fisiológicas en asociación con el tratamiento del cáncer en un paciente.

45 Los métodos para detectar cáncer y la progresión del cáncer incluyen (a) examen clínico (los síntomas pueden incluir hinchazón, bultos palpables, ganglios linfáticos agrandados, hemorragia, lesiones visibles de la piel y pérdida de peso); (b) imágenes (técnicas de rayos X, mamografía, colonoscopia, tomografía computarizada (CT y/o CAT), formación de imágenes mediante resonancia magnética (IRM), etc.); (c) ensayos de inmunodiagnóstico (por ejemplo, detección de CEA, AFP, La CA125, etc.); (d) radioimagen mediada por anticuerpos; y (e) análisis de inmunohistoquímica celular/tisular.

50 La administración de anticuerpos anti-KIR a un sujeto (ya sea por administración directa o expresión de un ácido nucleico en el mismo, tal como un vector de transferencia de genes víricos pox que comprende una secuencia o secuencias de ácido nucleico que codifica anticuerpos anti-KIR) se puede utilizar para reducir, tratar, prevenir o mejorar cualquier aspecto adecuado de la progresión del cáncer. Los usos médicos de la invención pueden ser particularmente útiles en la reducción y/o mejora del crecimiento tumoral, la migración del cáncer y la invasividad de las células cancerosas, como se describe adicionalmente en el presente documento. Los usos médicos que reducen, previenen o mejoran de otro modo dichos aspectos de la progresión del cáncer, de manera independiente y colectiva, son características ventajosas de la invención. Otros aspectos ventajosos de la invención incluyen la reducción de metástasis, la reducción de la diseminación de los tumores, la reducción del crecimiento del tumor y combinaciones de cualquiera de los mismos. Otro aspecto favorable es la eficacia de dichos métodos en el tratamiento de cánceres caracterizados por micrometástasis.

65 La detección de la progresión del cáncer se puede lograr mediante cualquier técnica adecuada, de las cuales se conocen varios ejemplos en la técnica. Los ejemplos de técnicas adecuadas incluyen PCR y RT-PCR (por ejemplo, de genes o "marcadores" asociados a células cancerosas), biopsia, microscopía electrónica, tomografía de emisión

de positrones (PET), tomografía computarizada, inmunosintigrafía y otras técnicas escintigráficas, formación de imágenes mediante resonancia magnética (IRM), cariotipo y otros análisis cromosómicos, técnicas de detección de inmunoensayo/inmunocitoquímico (por ejemplo, reconocimiento diferencial de anticuerpos), ensayos histológicos y/o histopatológicos (por ejemplo, de cambios en la membrana celular), estudios de cinética celular y análisis del ciclo celular, ecografía u otras técnicas de detección sonográfica, técnicas de detección radiológica, citometría de flujo, técnicas de visualización endoscópica y técnicas de exploración física. Ejemplos de estas y otras técnicas adecuadas se describen en, por ejemplo, Rieber et al., *Cancer Res.*, 36 (10), 3568-73 (1976), Brinkley et al., *Tex. Rep. Biol. Med.*, 37,26-44 (1978), Baky et al., *Anal. Quant. Cytol.*, 2 (3), 175-85 (1980), Laurence et al., *Cancer Metastasis Rev.*, 2 (4), 351-74 (1983), Cooke et al., *Gut*, 25 (7), 748-55 (1984), Kim et al, *Yonsei Med. J.*, 26 (2), 167-74 (1985), Graves, *Prog. Clin. Biol. Res.*, 212.151-67 (1986), McCoy et al., *Immunol. Ser.*, 53.171-87 (1990), Jacobsson et al., *Med. Oncol. Tumor. Pharmacother.*, 8 (4), 253-60 (1991), Swierenga et al., *IARC Sci. Publ.*, 165-93 (1992), Hirnle, *Lymphology*, 27 (3), 111-3 (1994), Laferte et al., *J. Cell Biochem.*, 57 (1), 101-19 (1995), Machiels et al., *Eur. J. Cell Biochem.*, 66 (3), 282-92 (1995), Chaiwun et al., *Pathology (Phila)*, 4 (1), 155-68 (1996), Jacobson et al., *Ann. Oncol.*, 6 (Suppl. 3), S3-8 (1996), Meijer et al., *Eur. J. Cancer*, 31A (7-8), 1210-11 (1995), Greenman et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 81 (4), 1628-33 (1996), Ogunbiyi et al., *Ann. Surg. Oncol.*, 4 (8), 613-20 (1997), Merritt et al., *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 123 (2), 149-52 (1997), Bobardieri et al., *Q. J. Nucl. Med.*, 42 (1), 54-65 (1998), Giordano et al., *J. Cell Biochem*, 70 (1), 1-7 (1998), Siziopikou et al., *Breast J.*, 5 (4), 221-29 (1999), Rasper, *Surgery*, 126 (5), 827-8 (1999), von Knebel et al., *Cancer Metastasis Rev.*, 18 (1), 43-64 (1999), Britton et al., *Recent Results Cancer Res.*, 157,3-11 (2000), Caraway et al., *Cancer*, 90 (2), 126-32 (2000), Castillo et al., *Am. J. Neurodiol.*, 21 (5), 948-53 (2000), Chin et al., *Mayo Clin. Proc.*, 75 (8), 796-801 (2000), Kau et al., *J. Orthohinologyngol. Relat. Spe.*, 62 (4), 199-203 (2000), Krag, *Cancer J. Sci. Am.*, 6 (Suppl. 2), S121-24 (2000), Pantel et al., *Curr. Opin. Oncol.*, 12 (1), 95-101 (2000), Cook et al., *Q. J. Nucl. Med.*, 45 (1), 47-52 (2001), Gambhir et al., *Clin. Nucl. Med.*, 26 (10), 883-4 (2001), MacManus et al., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 50 (2), 287-93 (2001), Ollila et al., *Cancer Control.*, 8 (5), 407-14 (2001), Taback et al., *Recent Results Cancer Res.*, 158,78-92 (2001) y la bibliografía citada en los mismos. Técnicas relacionadas se describen en las patentes de EE.UU. 6.294.343, 6.245.501, 6.242.186, 6.235.486, 6.232.086, 6.228.596, 6.200.765, 6.187.536, 6.080.584, 6.066.449, 6.027.905, 5.989.815, 5.939.258, 5.882.627, 5.829.437, 5.677.125 y 5.455.159 y las solicitudes de patente internacional WO 01/69199, WO 01/64110, WO 01/60237, WO 01/53835, WO 01/48477, WO 01/04353, WO 98/12564, WO 97/32009, WO 97/09925 y WO 96/15456.

Una reducción de la progresión del cáncer puede incluir, por ejemplo, cualquier disminución detectable en (1) la tasa de células normales que se transforman en células neoplásicas (o cualquier aspecto de las mismas), (2) la tasa de proliferación de células preneoplásicas o neoplásicas, (3) el número de células que muestran un fenotipo preneoplásico y/o neoplásico, (4) el área física de un medio celular (por ejemplo, un cultivo celular, tejido u órgano (por ejemplo, un órgano en un hospedador mamífero)) que comprende células preneoplásicas y/o neoplásicas, (5) la probabilidad de que las células normales y/o células preneoplásicas se transformen en células neoplásicas, (6) la probabilidad de que las células cancerosas progresen al siguiente aspecto de la progresión del cáncer (por ejemplo, una reducción en potencial metastásico) o (7) cualquier combinación de los mismos. Dichos cambios se pueden detectar utilizando cualquiera de las técnicas descritas anteriormente o equivalentes adecuados conocidos en la técnica, que se aplican normalmente en un momento adecuado antes de la administración de un régimen terapéutico para evaluar su eficacia. Los tiempos y las condiciones para evaluar si se ha producido una reducción en el potencial de cáncer dependerán de varios factores, incluido el tipo de cáncer, el tipo y la cantidad de anticuerpo anti-KIR, la composición relacionada o la composición combinada que se administra al hospedador. El experto en la materia será capaz de hacer determinaciones apropiadas de los tiempos y condiciones para realizar dichos ensayos aplicando técnicas y principios conocidos en la técnica con experimentación rutinaria.

Otros métodos útiles para diagnosticar la progresión del cáncer incluyen la clasificación de tumores y los métodos de estadificación, como el sistema de clasificación de estadificación general del American National Commission on Cancer, el método de estadificación general del National Program of Cancer Registries (también conocido como estadificación de resumen, estadificación de California y estadificación SEER) y/o sistemas de clasificación especializados de uso habitual (por ejemplo, un alto puntaje de grado de Gleason es indicativo de un cáncer agresivo en el contexto de cáncer de próstata; un sistema de estadificación TNM (tumor, nodos, metástasis) a menudo es útil en el contexto de cáncer colorrectal, y el sistema Scarff-Bloom-Richardson a menudo se utiliza en el contexto de las evaluaciones del cáncer de mama) (véase, por ejemplo, Fawcett and Drew, *Prof Nurse*. Abril de 2002; 17(8):470-2; Toloza et al., *Chest*. Enero de 2003;123(1 Suppl):157S-166S; Fischer et al., *Lancet Oncol*. Noviembre de 2001;2(11):659-66; y Perrotti et al., *Urology*. Agosto de 1999;54(2):208-14; Zinkin, *Dis Colon Rectum*. Enero de 1983;26(1):37-43; véase también en general Neal, *Clinical Oncology* (Oxford University Press - 3ª Ed. 2003), Price, *Treatment of Cancer* (Oxford University Press - 4ª Ed. 2002), Franks, *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer* (Oxford University Press - 3ª Ed. 1997); Bast et al., *Cancer Medicine*, 5ª edición (BC Decker Inc. - 2000); Adami, *Textbook of Cancer Epidemiology* (Oxford University Press 2002). Otros métodos para identificar el cáncer y/o diagnosticar la progresión del cáncer incluyen la metilación del ADN relacionada con los genes del cáncer (véase, por ejemplo, Carmen et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 93(22) (2001)), DNA cytometry, mitosis assays (as to frequency, normalcy, or both), pleomorphism evaluations, the presence of autocrine stimulatory loop activity, tubule formation measurements, keratinization assays, intercellular bridge formation assays, epithelial pearl detection, aberrant hormone receptor expression or form production assays (e.g., Her2 overexpression assays), and other cancer-associated gene expression assays (e.g., PRL-3 protein tyrosine phosphatase gene expression

assays). Además, los métodos de diagnóstico útiles se describen en la patente de EE.UU. 6.682.901 y la publicación PCT WO 03/033667. Los regímenes terapéuticos (que involucran, entre otras cosas, la administración de un anticuerpo anti-KIR a un paciente que lo necesita para reducir la progresión del cáncer en uno o más aspectos del mismo) se pueden practicar en asociación con la detección de una indicación de cáncer y/o progresión del cáncer en un paciente según lo determinado por cualquiera de estos u otros ensayos de diagnóstico descritos en el presente documento o sus equivalentes.

La progresión del cáncer de cualquier tipo adecuado de cáncer se puede reducir. Las formas de cáncer que pueden tratarse mediante el suministro o administración de anticuerpos anti-KIR, composiciones de anticuerpos anti-KIR y composiciones de combinación proporcionadas por la invención incluyen carcinoma de células escamosas, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, linfoma de células pilosas, linfoma de Burkitt, leucemias mielógenas agudas o crónicas, leucemia promielocítica, fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, melanoma, seminoma, teratocarcinoma, neuroblastoma, glioma, astrocitoma, neuroblastoma, glioma, schwannoma, fibrosarcoma, osteosarcoma, xeroderma pigmentoso, queratoacantoma y cáncer folicular de la tiroides. Los anticuerpos anti-KIR también pueden ser útiles en el tratamiento de otros carcinomas de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, próstata, páncreas, estómago, cuello del útero, tiroide o piel. Los anticuerpos anti-KIR también pueden ser útiles en el tratamiento de otros tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, otros tumores hematopoyéticos de linaje mieloides, otros tumores de origen mesenquimático, otros tumores del sistema nervioso central o periférico y / u otros tumores de origen mesenquimático.

En un aspecto particular, los anticuerpos anti-KIR se administran para reducir la progresión del cáncer en o asociados con un tumor hematopoyético de linaje linfoide. En aspectos más particulares, los anticuerpos anti-KIR se administran para reducir la progresión del cáncer en un tumor seleccionado de leucemia prolinfocítica T (T-PLL) (incluidas las células pequeñas y/o tipos de células cerebriformes de los mismos); leucemia de linfocitos granulares grandes (LGL) del tipo de linfocitos T; Síndrome de Sezary (SS); linfoma de leucemia de linfocitos T en adultos (ATLL); linfoma hepatosplénico a/d T-NHL; linfoma periférico/posttímico de linfocitos T del subtipo pleomórfico o inmunoblástico; linfoma de linfocitos T angio inmunoblásticos; linfoma angiocéntrico (nasal) de linfocitos T; linfoma anaplásico de células grandes (Ki 1+); linfoma intestinal de linfocitos T; Leucemia linfoblástica T; y/o linfoma/leucemia (T-LBLAT-ALL).

Ventajosamente, los usos médicos de la invención también pueden ser útiles para reducir la progresión del cáncer en células de cáncer de próstata, células de melanoma (por ejemplo, células de melanoma cutáneo, células de melanoma ocular y/o células de melanoma asociadas a ganglios linfáticos), células de cáncer de mama, células de cáncer de colon y células de cáncer de pulmón. Los usos médicos de la invención se pueden utilizar para reducir la progresión del cáncer en cánceres tanto tumorigénicos como no tumorigénicos (por ejemplo, cánceres hematopoyéticos no formadores de tumores). Los usos médicos son particularmente útiles en el tratamiento de cánceres epiteliales (por ejemplo, carcinomas) y/o cánceres colorrectales, cánceres de mama, cánceres de pulmón, cánceres de vagina, cánceres de cuello uterino y/o carcinomas de células escamosas (por ejemplo, de la cabeza y el cuello). Otras posibles dianas incluyen sarcomas y linfomas. Otras dianas ventajosas incluyen tumores sólidos y/o tumores diseminados (por ejemplo, tumores mieloides y linfoides, que pueden ser agudos o crónicos).

En otro aspecto, se reduce el riesgo de progresión del cáncer, se reduce el riesgo de una mayor progresión del cáncer en una población de células que se ha iniciado, y/o se reduce la progresión del cáncer en un paciente humano, que ha sido diagnosticado de tener células que exhiben niveles de células preneoplásicas y/o neoplásicas y/o tipos de expresión génica, tales como los patrones asociados a cáncer de la expresión génica de erbB2 (Her2/neu); expresión del gen p53; expresión del gen BRCA1 y/o BRCA2; expresión del gen PTEN; expresión de genes de la familia ras (k-ras, h-ras, m-ras, La RAB2, La RAP2A, etc.), expresión del gen c-MYC o expresión similar a cáncer de uno o más de los siguientes Exol, ASPP2, C/EBPD, p16(INK4a) CDKN2A, R24P, P81L, V126D, BNIP3, MYH, PTCH, B-ras, A-ras, PPAR (α , γ y Δ), MC1R, TP16p14/ARF, SMAD3, SMAD4, CDK4, p73, p15, AXIN1, raf, CHEK2, SHIP, HFE, p21(CIP1/WAF1), FAS, TSG101, MEN1, GSTP1, P2X7, BRAF, HPV tipo 16 E7, P27 Ciclina E, Ciclina D, Rb, P300, Mdm2, Fos, Jun, N-Ras, Ki-Ras, Raf-1, Abl, Bcl-2, Bcl-6, Bax, APC (N.º de referencia: M74088), betacatenina, E-cadherina, PI3-kinasa, TGF α , TGF β , receptor TGF β , Src, Met, Akt, Alk, Grb2, Shc y E2F 1-5. En un aspecto a modo de ejemplo particular, la progresión del cáncer se inhibe (ya sea antes o después de la detección de cualquier aspecto del mismo) en un ser humano que exhibe una regulación/expresión similar al cáncer de Ras y Myc; expresión de Ras con pérdida de la actividad regular del gen p53; expresión de Ras con pérdida de la actividad regular de Rb; expresión de Ras con pérdida de la actividad regular de NPK β ; expresión de Ras con pérdida de la actividad regular de APC; expresión de Ras con pérdida de la actividad regular de Arf; expresión de Ras con E7; etc.

En otro aspecto ejemplar, la proporción de células neoplásicas quiescentes a invasivas aumenta en un hospedador mamífero que comprende administrar la combinación o composición de combinación de la invención para aumentar la proporción de células quiescentes a células invasivas en el hospedador.

En un aspecto adicional, la remisión de un cáncer en un hospedador mamífero, tal como un paciente humano, se puede promover mediante un método que comprende administrar una composición que comprende el anticuerpo anti-KIR, tal como el anticuerpo anti-KIR que compite con el AcM DF200 (inhibe relativamente a un nivel de al menos

aproximadamente el 10 % mediante el ensayo ELISA, tal como aproximadamente el 15 % o más, 20 % o más, 25 % o más, etc.), al hospedador, para promover la remisión del cáncer en el hospedador.

5 Otros aspectos son la reducción del riesgo de desarrollar una afección cancerosa, la reducción del tiempo de aparición de una afección cancerosa, la reducción de la gravedad de un cáncer diagnosticado en las primeras etapas y/o la reducción del área afectada de un cáncer al desarrollarse en un hospedador mamífero, mediante un método que comprende administrar a un hospedador una cantidad profilácticamente eficaz del anticuerpo anti-KIR o composición de combinación de la invención para lograr el (los) efecto(s) fisiológico(s) deseado(s).

10 En otro aspecto, la inhibición del crecimiento del tumor y/o de la metástasis en un individuo que lo necesite se proporciona mediante un método, que comprende poner en contacto el tumor con una cantidad del anticuerpo anti-KIR o composición de combinación de la invención, para inhibir el crecimiento del tumor y/o la metástasis. Los tumores diana pueden incluir carcinomas. Dichos carcinomas incluyen carcinomas de células escamosas (incluyendo carcinoma de células escamosas de piel, cuello uterino y vulva), carcinomas gástricos, adenocarcinomas
15 de colon, carcinomas colorrectales y carcinomas de cuello uterino. Otros carcinomas que se pueden tratar incluyen carcinomas mamarios ductales. Otros cánceres habituales que se pueden tratar incluyen melanomas malignos.

Inhibir el crecimiento del tumor generalmente significa causar una reducción en la cantidad de crecimiento del tumor que se produciría en ausencia de tratamiento y/o el cese sustancialmente completo del crecimiento del tumor detectable, e incluye disminuciones en el tamaño del tumor y/o disminución en la tasa de crecimiento del tumor. Inhibir la metástasis significa reducir la cantidad de metástasis tumoral que se produciría en ausencia de tratamiento e incluye una disminución relativa en el número y/o tamaño de las metástasis.

20 Aún en un aspecto diferente, se provoca, promueve y/o mejora un efecto antitumoral mediante la disminución del crecimiento, la diseminación o el crecimiento y la diseminación del frente de un tumor en los tejidos circundantes, o el crecimiento, la diseminación o el crecimiento y la diseminación esperados. La inhibición del crecimiento de células tumorales se puede medir mediante cualquier estándar y técnica adecuados utilizando, por ejemplo, otros métodos descritos en el presente documento y/o ensayos de inhibición tales como los descritos en el documento WO 89/06692.

30 Un aspecto adicional para inhibir o ralentizar el crecimiento y/o la diseminación de un tumor en el tejido circundante es administrar a un paciente que lo necesite un anticuerpo anti-KIR u otro anticuerpo anti-KIR eficaz, un compuesto relacionado o una composición de combinación.

35 Los usos médicos de la invención también pueden ser particularmente ventajosos con respecto a la eliminación de micrometástasis y/o para la prevención de una recurrencia de cáncer en un paciente previamente diagnosticado con cáncer pero actualmente en un estado de remisión. Los métodos para evaluar la recurrencia y/o el riesgo de recurrencia son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 6.656.684) y pueden incluir la aplicación de otros métodos de diagnóstico de cáncer descritos en el presente documento.

40 En un aspecto adicional, la probabilidad de supervivencia aumenta durante un período relevante en un paciente humano diagnosticado con cáncer. Por ejemplo, la probabilidad de supervivencia aumenta aproximadamente seis meses, aproximadamente nueve meses, aproximadamente un año, aproximadamente tres años o más después del tratamiento con la composición de anticuerpos anti-KIR de la invención, en comparación con no recibir tratamiento
45 con la composición de anticuerpos anti-KIR (las tasas de supervivencia se pueden determinar mediante, por ejemplo, estudios en una población de pacientes similares, tales como en el contexto de un ensayo clínico).

En otro aspecto, la calidad de vida de un paciente con cáncer se mejora mediante la administración al paciente de una composición de la invención en una cantidad eficaz para mejorar la calidad de vida del mismo. Los métodos para evaluar la calidad de vida del paciente en el tratamiento del cáncer son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Movass y Scott, Hematol Oncol Clin North Am. 2004 Feb;18(1):161-86; Dunn et al., Aust N Z J Public Health. 2003;27(1):41-53; Morton e Izzard, World J Surg. Julio de 2003;27(7):884-9; Okamoto et al., Breast Cancer. 2003;10(3):204-13; Conroy et al., Expert Rev Anticancer Ther. Agosto de 2003;3(4):493-504; List et al., Cancer Treat Res. 2003;114:331-51; y Shimozuma et al., Breast Cancer. 2002;9(3):196-202).

55 En un aspecto adicional, los usos médicos de la invención reducen significativamente el número de células cancerosas en un hospedador vertebrado, de modo que, por ejemplo, se reduce el número total y/o el tamaño de los tumores. Dichos métodos se pueden aplicar para tratar cualquier tipo de tumor adecuado, incluyendo tumores quimiorresistentes, tumores sólidos y/o tumores metastatizados. En un sentido relacionado, las células preneoplásicas y/o neoplásicas pueden destruirse en un vertebrado, como un paciente humano con cáncer.
60

Ejemplo 1

65 Correlación *in vitro* de la actividad mejorada de las células NK como resultado de la terapia de combinación con anticuerpos anti-KIR e interferón alfa/beta recombinante.

Se mezclan células NK humanas (recién aisladas o precultivadas *in vitro* con interleucina-2 durante 2-14 días) con células diana marcadas con cromo (por ejemplo, linfocitos B K562 o EBV transformados) en un ensayo de citotoxicidad estándar de 4 horas en presencia de uno o más anticuerpos anti-KIR e interferón alfa o beta. Se espera que la combinación de como resultado una lisis específica mejorada en comparación con la "monoterapia" con anticuerpos KIR o interferón alfa/beta solo.

Ejemplo 2

Como se mencionó anteriormente, los receptores inhibidores de NK específicos de MHC de clase I incluyen KIR en seres humanos (véase, por ejemplo, A. Moretta et al., *J Exp Med* 178, 597-604 (1993); N. Wagtmann et al., *Immunity* 2, 439-449 (1995); M. Colonna y J. Samaridis, *Science* 268, 405-408 (1995); y V. Litwin, J. Gumperz, P. Parham, J. H. Phillips, L. L. Lanier, *J Exp Med* 180, 537-543 (1994)), Ly49 en roedores (véase, por ejemplo, F. M. Karlhofer, R. K. Ribaud, W. M. Yokoyama, *Nature* 358, 66-70 (1992)) y los receptores conservados CD94/NKG2A en ambas especies (V. M. Braud et al., *Nature* 391,795-799 (1998)). Tras la participación de las moléculas MHC de clase I, estos receptores transmiten señales negativas que inhiben la lisis mediada por células NK (véase, por ejemplo, Karlhofer et al. (1992), mencionado anteriormente, Braud et al. (1998), mencionado anteriormente, y N. Wagtmann, S. Rajagopalan, C. C. Winter, M. Peruzzi, E. O. Long, *Immunity* 3, 801-809 (1995)).

Para probar los efectos de los tratamientos de combinación como terapia de cáncer basada en el bloqueo mediado por AcM de los receptores inhibidores (IR, de sus siglas en inglés) junto con otros agentes anticancerígenos, se utilizó un modelo de ratón en el que el anticuerpo NK-CIR estaba representado por el anticuerpo 5E6 dirigido contra Ly49I/C (véase C. Y. Koh et al., *Blood* 97, 3132-3137 (2001)). El anticuerpo 5E6 funciona de manera análoga a los AcM anti-KIR (debido a la similitud entre los receptores Ly49 y KIR). En el modelo de tumor de ratón, el AcM anti-IR se usó en combinación con citocinas que estimulan la proliferación o activación de las células NK, tal como la IL-2 (como se describe en este Ejemplo) y la IL-21 (como se describe en el Ejemplo 3).

Se inocularon subcutáneamente ratones endogámicos C57BL/6 con células de melanoma murino B16.F10, y se midió el tamaño del tumor al menos dos veces por semana con un calibrador digital. El tratamiento terapéutico se inició 3 días después de la inoculación de las células tumorales. En ese momento los tumores sólidos eran reconocibles. Los ratones se asignaron al azar en 4 grupos (n = 8), que recibieron A) sin tratamiento, B) una administración semanal de AcM anti-Ly49I/C (Fab'2), C) un ciclo de tres días de administración sistémica de IL-2 humana repetida cada semana, o D) una combinación de administración de anti-Ly49I/C e IL-2 en el mismo programa que el anterior.

Tal como puede observarse en la figura 1, el anti-Ly49 solo no mostró ningún efecto sobre el crecimiento de los tumores B16 en este contexto, mientras que el IL-2 solo, en las dosis aplicadas aquí, tuvo un ligero efecto antitumoral, que no fue estadísticamente significativo. Sin embargo, cuando se administró la combinación de AcM anti-Ly49I/C e IL-2, se observó un fuerte efecto antitumoral, con una reducción altamente significativa estadísticamente ($p > 0,002$) en la carga tumoral en comparación con los grupos no tratado y el tratado con anti-Ly49, y con una reducción significativa ($p > 0,05$) en la carga tumoral en comparación con el grupo tratado con IL-2 solo (prueba T de dos colas con varianza igual).

Estos resultados indican que el AcM anti-Ly49I/C se sinergiza inesperadamente con IL-2 para promover la eliminación de tumores mediada por el sistema inmunitario. Como se indicó anteriormente, se espera una sinergia similar (basada en la relación de dichos receptores de células NK) para combinaciones de anticuerpos anti-KIR y proteínas IL-2, incluidas las variantes de IL-2 y derivados que tienen actividad biológica similar a la IL-2, en pacientes humanos.

Ejemplo 3

Se usó un ensayo de depuración pulmonar de 3 horas, generalmente basado en el método descrito en Jia et al., *J. Immunol.*, 165 (11):6142-7 (2000), para demostrar que la combinación de interleucina-21 murina (mIL-21) y los anticuerpos anti-Ly49I/C (como se señaló anteriormente, estos son anticuerpos contra homólogos murinos de KIR humano) aumenta significativamente la depuración pulmonar del melanoma B16F10 y el linfoma RMA en comparación con cualquier agente administrado solo. Específicamente, se probaron mIL-21 y un fragmento de anticuerpo con efectos antitumorales conocidos administrados solos y en combinación en los dos modelos diferentes de tumores singénicos bien conocidos, el melanoma B16F10 y el linfoma RMA. 5E6 es un fragmento monoclonal F(ab')₂ contra los receptores inhibidores de Ly49C y Ly49I en células NK (homólogos de ratón de KIR humano) (véase, por ejemplo, Koh et al., *Biol Blood Marrow Transplant.* 2002;8(1): 17-25 y Koh et al., *Blood*, 97(10):3132-3137 (2001)).

En particular, las células tumorales RMA o B16F10 marcadas con ⁵¹Cr se inyectaron *i.v.* (5x10⁵ células) en ratones C57BL/6 singénicos. La retención de radioactividad en los pulmones se puntuó después de 3 horas. Los ratones tratados con IL-21 se inyectaron *s.c.* con una dosis de 50 µg los días -3, -2 y -1 antes de la inyección de células tumorales. Los ratones tratados con 5E6 se inyectaron *i.v.* con una dosis de 50 µg (panel superior y medio) o 25 µg (panel inferior) el día -1 antes de la inyección de células tumorales. Los resultados se expresan como porcentaje de

la radiactividad total inoculada. Media \pm EEM, f-test. Los resultados de estos experimentos se presentan en la Figura 2 (el eje vertical representa el porcentaje de radioactividad retenida en los pulmones en relación con el control).

5 Estos datos demuestran que tanto la terapia con citocinas mL-21 como el bloqueo de los receptores Ly49C/I en las células NK aumentan la actividad antitumoral en el pulmón. La diferencia en el tratamiento con cualquier compuesto fue significativamente diferente del control y el tratamiento para la combinación de cualquier agente tomado solo en el pulmón (las mediciones en el hígado y el bazo no mostraron dichas diferencias, posiblemente debido a, por ejemplo, un número insuficiente de células en el caso del bazo y posible mezcla de células y fragmentos de células contenidos en el hígado). Sin embargo, se encontró una actividad antitumoral adicional en los grupos tratados con
10 ambos compuestos, lo que sugiere que la combinación de IL-21 y anti-KIR podría producir una respuesta antitumoral más fuerte que cualquiera de los agentes administrados solos.

15 El uso de los términos "un" y "uno/una" y "el/la" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención debe interpretarse de modo que cubra tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente en el contexto.

A menos que se indique otra cosa, todos los valores exactos proporcionados en el presente documento son representativos de los valores aproximados correspondientes (por ejemplo, se puede considerar que todos los valores a modo de ejemplo exactos proporcionados con respecto a un factor o medida en particular también
20 proporcionan una medida aproximada correspondiente, modificada por "aproximadamente", cuando sea adecuado).

LISTADO DE SECUENCIAS

25 <110> Novo Nordisk A/S
<120> TRATAMIENTOS Y MÉTODOS DE COMBINACIÓN ANTI-KIR
<130> M/54291-EP-DIV2
30 <150> EP06700713.8
<151> 06/01/2006
<150> DK20050000026
35 <151> 06/01/2005
<160> 16
<170> PatentIn versión 3.3
40 <210> 1
<211> 128
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
45 <400> 1

ES 2 732 623 T3

Met Glu Ser Gln Thr Leu Val Phe Ile Ser Ile Leu Leu Trp Leu Tyr
 1 5 10 15

Gly Ala Asp Gly Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser
 20 25 30

Met Ser Val Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn
 35 40 45

Val Val Thr Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro
 50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
 65 70 75 80

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Gly Tyr
 100 105 110

Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

5 <210> 2
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 2

ES 2 732 623 T3

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser
 20 25 30

Met Ser Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser
 35 40 45

Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 50 55 60

Ser Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly
 65 70 75 80

Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu
 85 90 95

Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His
 100 105 110

Gln Tyr His Arg Ser Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 115 120 125

Ile Lys Arg
 130

<210> 3
 <211> 11
 5 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 3

Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr Val Ser
 10 1 5 10

<210> 4
 <211> 12
 15 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 4

Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Tyr
 20 1 5 10

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 25 <213> *Mus musculus*

<400> 5

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
 1 5

5 <210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 6

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

15 <210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 7

Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

25 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 8

His Gln Tyr His Arg Ser Pro Pro Thr
 1 5

35 <210> 9
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 9

Met Ala Val Leu Gly Leu Leu Phe Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Phe
 35 40 45

Thr Pro Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

ES 2 732 623 T3

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala
65 70 75 80

Ala Phe Ile Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
85 90 95

Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Val Asn Asp Thr Ala Ile Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asn Pro Arg Pro Gly Asn Tyr Pro Tyr Gly Met Asp
115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

5 <210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 10

10 Gly Phe Ser Phe Thr Pro Tyr Gly Val His
1 5 10

15 <210> 11
<211> 16
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 11

20 Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser
1 5 10 15

25 <210> 12
<211> 13
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 12

30 Asn Pro Arg Pro Gly Asn Tyr Pro Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5 10

35 <210> 13
<211> 109
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 13

ES 2 732 623 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Val Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Met Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105

5 <210> 14
 <211> 327
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 14

gaaattgtgt tgacacagtc tccagtcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
 gaagatthttg cagtttatta ttgtcagcag cgtagcaact ggatgtacac ttttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa acgaact 327

15 <210> 15
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-KIR2DL con reacción cruzada con KIR2DL1 y KIR2DL2/3, o un fragmento de unión del mismo, y una interleucina-21 para la fabricación de un medicamento para tratar cáncer.
- 10 2. El uso de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo anti-KIR2DL o el fragmento de unión del mismo compiten con el anticuerpo DF200, producido por el hibridoma depositado como CNCM I-3224, en la unión al receptor humano KIR2DL1, al receptor humano KIR2DL2/3 o a ambos receptores humanos KIR2DL1 y KIR2DL2/3.
- 15 3. El uso de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en el que el anticuerpo anti-KIR2DL o el fragmento de unión del mismo compiten con un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada (V_H) que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 15 y un dominio variable de cadena ligera (V_L) que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 13 en la unión al receptor humano KIR2DL1, al receptor humano KIR2DL2/3 o a ambos receptores humanos KIR2DL1 y KIR2DL2/3.
- 20 4. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el anticuerpo anti-KIR2DL o el fragmento de unión del mismo comprenden un dominio V_H que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 15 y un dominio V_L que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 13.
- 25 5. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el anticuerpo anti-KIR2DL o el fragmento de unión del mismo comprenden las CDR en el dominio V_H que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 15 y las CDR en el dominio V_L que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 13.
- 30 6. Una composición farmacéuticamente aceptable que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-KIR2DL con reactividad cruzada con KIR2DL1 y KIR2DL2/3 o un fragmento de unión del mismo para su uso en el tratamiento del cáncer en combinación con una interleucina-21.
- 35 7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el anticuerpo anti-KIR2DL o el fragmento de unión del mismo compiten con el anticuerpo DF200, producido por el hibridoma depositado como CNCM I-3224, en la unión al receptor humano KIR2DL1, al receptor humano KIR2DL2/3 o a ambos receptores humanos KIR2DL1 y KIR2DL2/3.
- 40 8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en donde el anticuerpo anti-KIR2DL o el fragmento de unión del mismo compiten con un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada (V_H) que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 15 y un dominio variable de cadena ligera (V_L) que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 13 en la unión al receptor humano KIR2DL1, al receptor humano KIR2DL2/3 o a ambos receptores humanos KIR2DL1 y KIR2DL2/3.
- 45 9. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en la que el anticuerpo anti-KIR2DL o el fragmento de unión del mismo comprenden un dominio V_H que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 15 y un dominio V_L que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 13.
- 50 10. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en la que el anticuerpo anti-KIR2DL o el fragmento de unión del mismo comprenden las CDR en el dominio V_H que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 15 y las CDR en el dominio V_L que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 13.
- 55 11. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o la composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-10, en donde el cáncer es cáncer de pulmón.
12. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o la composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-10, en donde el cáncer se selecciona de tumores hematopoyéticos de linaje linfóide, tumores hematopoyéticos de linaje mielóide y cánceres hematopoyéticos no formadores de tumores.
- 60 13. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o la composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-10, en donde el cáncer se selecciona de leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, linfoma de Burkitt, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia promielocítica, leucemia T-prolinfocítica, leucemia de linfocitos granulares grandes del tipo de linfocitos T, síndrome de Sézary, linfoma de leucemia de linfocitos T en adultos (ATLL), linfoma hepatosplénico a/d T-NHL, linfoma periférico/posttímico de linfocitos T del subtipo pleomórfico o inmunoblástico, linfoma angioinmunoblástico de linfocitos T, linfoma angiocéntrico (nasal) de linfocitos T, linfoma anaplásico de células grandes ($Ki-1^+$), linfoma intestinal de linfocitos T, leucemia linfoblástica T y linfoma linfoblástico T.
- 65

FIGURA 1

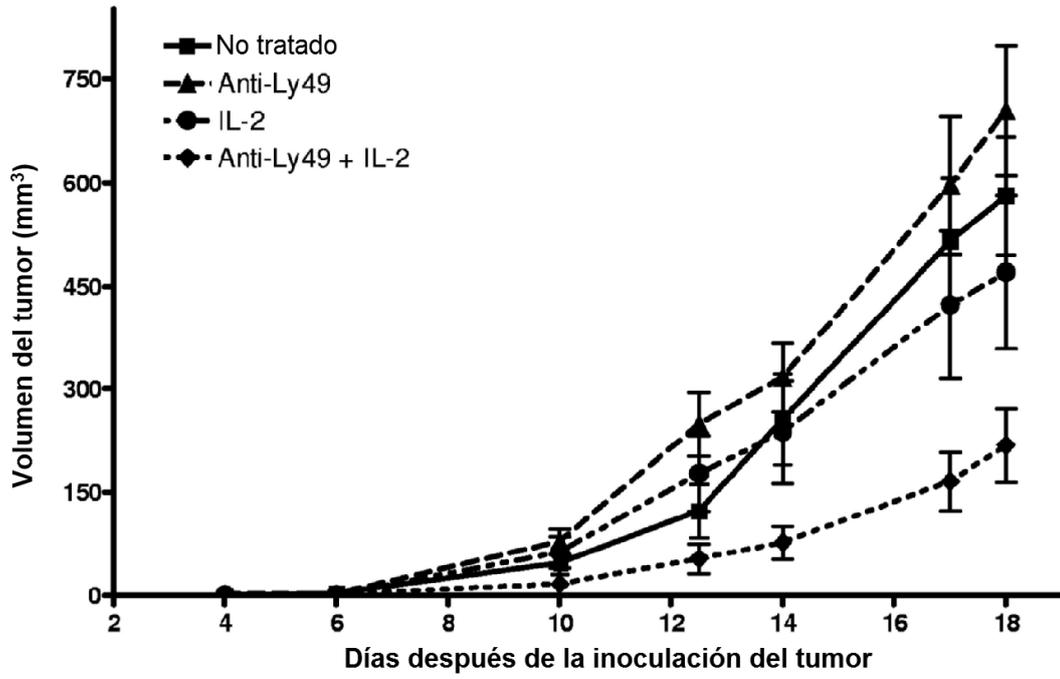


FIGURA 2

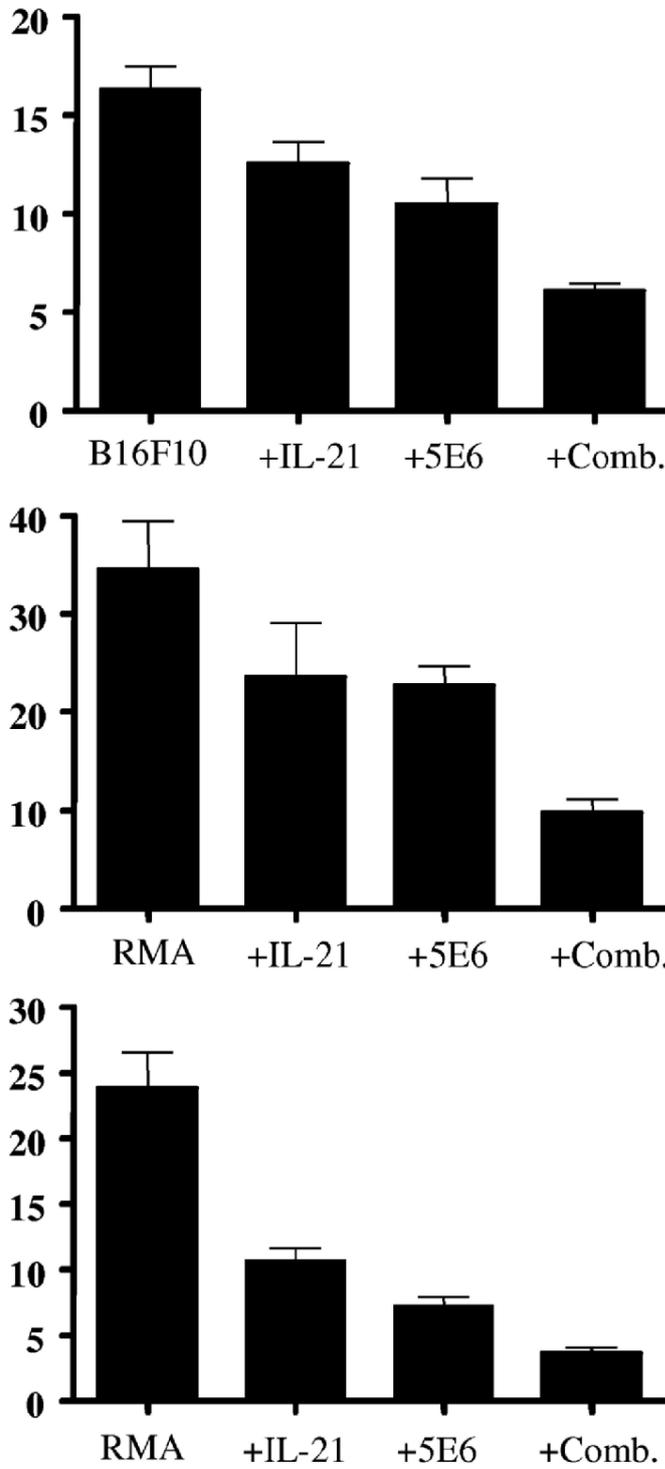


FIGURA 3

A

Variable de cadena ligera de DF-200	(1)	M--ESQTLVEISILLWLYCADGNLVMTQSPKSMMSVGERVLTICKASEN	1	50
Variable de cadena ligera de PAN2D	(1)	MDFQVQIFSEELISASVIMSRGQIVLTQSPASMSASLGERVLTCTASSS		
Consenso	(1)	Q F I I L A GNIVLTQSP SMS SLGERVLTIC AS		
Variable de cadena ligera de DF-200	(49)	VVYLVVSWYQKPEQSPKLLYGASNRVYGVVDRFTEGGSATDFTLTISS	51	100
Variable de cadena ligera de PAN2D	(51)	VSSSYLYWYQQKPGSSPKLWLYSTSNLASGVPARFSGSGSTISYSLTISS		
Consenso	(51)	V S YL WYQQK SPKLY SN SGVP RPSGSGSAT FSLTISS		
Variable de cadena ligera de DF-200	(98)	VQAEDLADYHGGQYSYFYTFGGGTTKLEIKR	101	131
Variable de cadena ligera de PAN2D	(101)	MEAEADAATYHCHQYHRSPPTFGGGTTKLEIKR		
Consenso	(101)	M AED A YHC Q H P TFGGGTTKLEIKR		

B

Variable de cadena ligera de DF-200	(44)	KASENVVYVVS (SEQ ID NO.3)
Variable de cadena ligera de PAN2D	(46)	TASSVSSSYLY (SEQ ID NO.4)
Consenso		AS V S YL

C

Variable de cadena ligera de DF-200	(70)	GASNRVY (SEQ ID NO.5)
Variable de cadena ligera de PAN2D	(73)	STSNLAS (SEQ ID NO.6)
Consenso		SN S

D

Variable de cadena ligera de DF-200	(109)	GGQYSYFY (SEQ ID NO.7)
Variable de cadena ligera de PAN2D	(112)	HQYHRSPP (SEQ ID NO.8)
Consenso		Q H P T

FIGURA 4

VH de DF200

A

MAVLGLLFCLVTFPSCVLS

QVQLEQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSFTPYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGGNTDY
NAAFISRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQVNDTAIYYCARNPRPGNYPYGMDYWGQGTSVT
VSS (SEQ ID NO:9)

B

GFSFTPYGVH (SEQ ID NO:10)

C

VIWSSGGNTDYNAAFIS (SEQ ID NO:11)

D

NPRPGNYPYGMDY (SEQ ID NO:12)

FIGURA 5

VL y VH de 1-7F9

A

EIVLTQSPVTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARF
SGSGSGTDFLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWMYTFGQGTKLEIKRT (SEQ ID NO:13)

B

Gaaattgtgtgacacagctccagtcacccigtctttgtctccaggggaaagagccacccctcctgcagggccagtcagagtgtt
agcagctacttagcctggtaccaacagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatgatgcatccaacagggccactggc
atcccagccaggttcagtggtcagtggtctgggacagactcactctcaccatcagcagcctagagcctgaagatttgcagttat
tattgtcagcagcgtagcaactggatgtacactttggccaggggaccaagctggagatcaaacgaact (SEQ ID NO:14)

C

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSFYAISWVRQAPGQGLEWMGGFIPIFGAANY
AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSDDTAVYYCARIPSGSYYYDYDMDVWGQGTITVTV
SS (SEQ ID NO:15)

D

Caggtccagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctgggtcctcggtgaaggtcctgcaaggcttctggaggcacc
ttcagtttctatgctatcagctgggtgcgacaggccccctggacaagggcttgagtggtgggaggggtcatccctatcttgggtgcag
caaaactcgcacagaagtccagggcagagtcacgattaccgaggacgaatccacgagcacagcctacatggaactgagca
gcctgagatctgacgacacggccgtgtattactgtgcgagaatcccctagtgaggctactactacgactacgatatggacgtctgg
ggccaagggaccacgggtcaccgtctcctca (SEQ ID NO:16)